

Genotoksisitet av 5-hydroxymetylfurfural i transgene LacZ mus med mutasjon i adenomatøs polyposis coli

Lena Jørgensen-Kaur



Masteroppgave i toksikologi
Biologisk institutt

OSLO UNIVERSITET

September 2012

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved det Nasjonale folkehelseinstitutt, avdeling mat, vann og kosmetikk (MIVM).

Jeg må takke for et par flotte år hvor jeg har fått tilegnet meg mye kunnskap rundt mange fine mennesker.

Tusen takk til veilederen min, Trine Husøy, som har en utrolig smittende entusiasme, godt humør og hvis gode råd og hjelp jeg aldri hadde klart meg uten.

Takk til Steinar Øvrebø som også stilte opp som veileder.

Takk til ingeniørene Tone Rasmussen og Hildegunn Dahl som har gitt meg mange gode innspill og som har bidratt til å gjøre mastertiden til en fin tid.

Spesielt takk til ingeniøren Hege Hjertholm som har lært meg både PCR og sekvensering, som har gitt meg så mange gode råd og som alltid har hatt et godt humør og en positiv innstilling.

Videre må jeg takke stipendiaten Anja Hortemo Sæther for nyttig informasjon og postdoktoranden Camilla Svendsen for uvurderlig hjelp og gode råd.

Jan Van Benthem og Edwin Zwart fortjener også en stor takk for analysene på mutantfrekvens.

Jeg må også takke min gode venninne Hannah-Elise Nyvold som har vært en gledesspreder når dagene har vært tunge.

Jeg må heller ikke glemme å takke både mamma og svigermor for å ha stilt opp når jeg har trengt dem.

Sist og ikke minst må jeg takke mannen min, Amanpreet Singh, som har holdt ut med meg og støttet meg under mastertiden.

Oslo, august 2012

Lena Jørgensen-Kaur

Abstract

5-hydroxymethylfurfural (HMF) is formed in the Maillard reaction when reduced sugars are heated in the presence of amino acids or proteins. It can also be formed during direct thermal dehydration of fructose and sucrose, without amino acids.

HMF is found in high levels in coffee, bread, cereals, plums, caramel and formula. The daily intake of the compound is estimated to be between 30-150 mg pr person.

Several *in vitro* experiments have demonstrated a weak genotoxic effect of HMF. Other studies have identified increased aberrant crypt foci and micro adenomas in the colon of mice due to HMF treatment. To our knowledge there have not been published any previous reports on the genotoxicity of HMF *in vivo* until now.

LacZ/wt and LacZ/Min mice treated with 750 mg/kg bw HMF by gavage or 500 mg/kg bw HMF by subcutaneous injection was sacrificed and their organs isolated to establish the genotoxic effect of HMF by measuring the mutant frequency and the ratio of size changes and amount of oxidative damage in the LacZ plasmid. This experiment also evaluated whether having a mutated Apc gene made the DNA more prone to damages after HMF treatment.

HMF did not seem to affect the mutant frequency or lead to increased oxidative damage in the DNA. There is on the other hand a significant difference in the ratio of size changes between HMF treated mice and control mice. Having a mutated *Apc* gene did not lead to increased sensitivity towards DNA damage. Over all, HMF is concluded not to be genotoxic in LacZ plasmid mice in this study. The low activity of sulfotransferases (SULT) in mice can be the reason for the negative results. It is recommended for a new research experiment to be carried out using transfected mice carrying human sulfotransferases (SULT mice).

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	9
1.1 5-hydroksymetylfurfural (HMF).....	9
1.1.1 Diettinntak.....	9
1.1.2 HMF dannelse under varmebehandling av mat.....	10
1.1.3 Biotransformasjon	12
1.1.4 Toksisitet	13
1.2 Andre furanderivativer	14
1.3 Humane cytosole sulfotransferaser	15
1.4 Tarmkreft.....	16
1.5 Adenomatøs polypose coli (APC)	19
1.5.1 APC genet- plassering i genomet og oppbygning.....	19
1.5.2 APCs mekanisme for undertrykkelse av svulstutvikling	20
1.5.3 APC er involvert i aktin cytoskjelett integritet, celle-celle adhesjon og celle migrering.....	21
1.5.4 Familiær adenomatøs polypose (FAP).....	21
1.5.5 Mutasjon i APC genet er et av de første stegene på veien til utvikling av tarmkreft	22
1.5.6 Stadfestelse av sykdomsfenotype ved lokalisering av APC mutasjon.....	22
1.5.7 Betydningen av APC i DNA reparasjon	23
1.6 Musmodeller- Bruk av transgene musmodeller i testing av genotoksisitet	24
1.6.1 Multiple intestinal (Min) mus.....	24
1.6.2 LacZ plasmid mus	25
1.7 Oksidative skader i DNA	26
1.8 Aldehyd metabolisme og toksisitet.....	28
1.9 Polymerase kjedereaksjon (PCR).....	28
1.10 DNA sekvensering.....	29
1.11 Plasmid isolering og bestemmelse av mutant frekvens.....	31
1.12 Kilder for artefakter.....	32
1.13 Målsetting.....	34
2. Materialer og metoder	35
2.1 Kjemikalier	35
2.2 Annet utstyr.....	35
2.3 Dyr	36
2.4 Dyreforsøk.....	36

2.4.1 HMF injiseringsforsøk.....	37
2.4.2 HMF sondeforingsforsøk	37
2.5 DNA isolering og mutantfrekvensanalyse	37
2.6 Størrelsesendring og ingen størrelsesendring analyse	37
2.6.1 Oppdyrking av LacZ kloner	38
2.6.2 PCR amplifikasjon	38
2.6.3 Restriksjonsenzym kutting.....	39
2.6.4 Gel elektroforese analyse	41
2.7 DNA sekvensering.....	42
2.7.1 Oppdyrking av LacZ kloner og DNA isolering.....	42
2.7.2 Måle DNAets mengde og renhet ved nanodrop	44
2.7.3 Sekvensering.....	45
2.7.4 Analysering av sekvenseringsresultatene	47
2.8 Statistikk	47
3. Resultater	48
3.1 Resultater fra sondeforingsforsøk.....	48
3.2 Resultater injiseringsforsøk.....	50
4. Diskusjon	54
5. Konklusjoner.....	66
6. Referanser	67
7. Vedlegg.....	72

1. Introduksjon

1.1 5-hydroksymetylfurfural (HMF)

5-Hydroksymetylfurfural (HMF) er et stoff som oppstår ved varmebehandling og tørking av karbohydratrike matvarer (Glatt H. 2006). HMF er relativt lite forsket på når det gjelder hvilken mulig påvirkning stoffet har på menneskekroppen. I den siste tiden har stoffet fått større oppmerksomhet, blant annet fordi HMF er mistenkt for å være genotoksisk. Frem til 2005 var det tillatt å tilsette HMF til mat som et aromastoff. På grunn av mistanken om HMF genotoksisitet, ble det avventet en ny vurdering av HMF i 2005 (EFSA 2005). HMF ble godkjent i 2011 og dermed lovlig å bruke som aromastoff (EFSA 2011).

1.1.1 Diettinntak

Den viktigste kilden til humant inntak av HMF er fra mat og drikke. HMF finnes i mange ulike matvarer og det gjennomsnittlige daglige inntaket ligger mellom 30-150 mg pr person. Høye nivåer av HMF har blitt målt i karamell produkter (110-9500 mg/kg), tørket frukt (spesielt plomme (1600-2200 mg/kg)), kaffe (300-1900mg/l), gammel Portvin og Madeira viner (620-840 mg/l) og balsamico eddik (316-3251mg/l). Frokostblandinger (4-193 mg/kg), brødskorpe(6,8-410 mg/kg), og ferdiglaget morsmelkerstatning (2,2-8,1mg/l) inneholder lavere konsentrasjoner HMF. Selv om nivået er lavere i disse produktene, så konsumeres de i større mengder og kan derfor bidra vesentlig til HMF inntaket. Eksponering via luftveier kan også forekomme ettersom HMF har blitt funnet i sigarettøyk kondensat, tre røyk og røykaromaer (Glatt H. 2006).

I Spania ble det gjennomført en studie av Morales, Romero et al. (1996) hvor mengden HMF i pasteurisert, ultra høyt temperert (UHT) og sterilisert melk ble målt til henholdsvis 0,5-1.1 µM, 1,77-5,16 µM og 1,93 til 12,43 µM HMF.

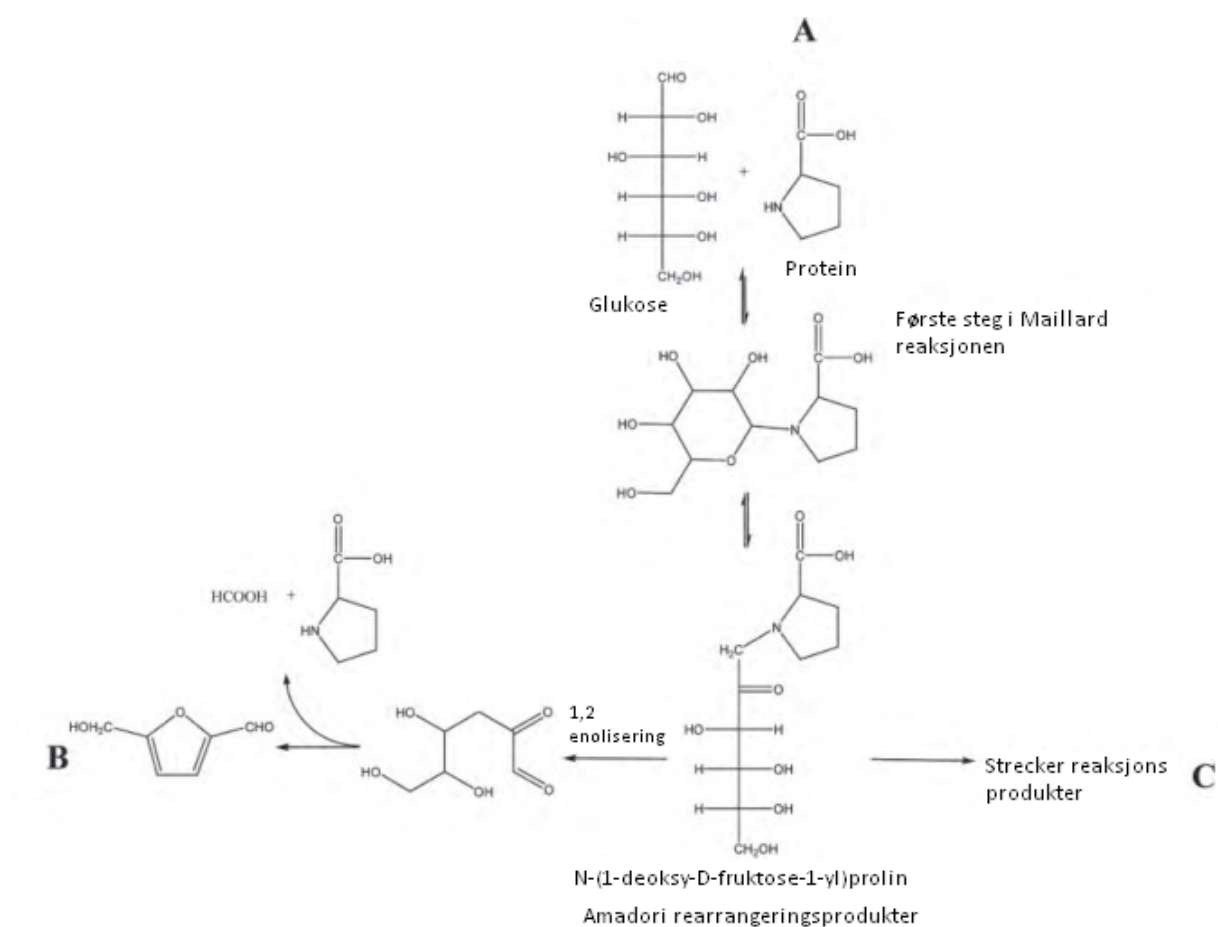
Husoy, Haugen et al. (2008) var de første som publiserte en human studie der estimert HMF inntak ble sammenlignet med mengden av HMF metabolitten 5-hydroksymetyl-2-furoic acid (HMFA) i urinen. De beregnet det gjennomsnittlige HMF inntaket hos 53 forsøkspersoner over en 24 timers periode ut i fra rapportert konsum av matvarer og HMF nivåer målt i matvarene. De kom fram til at rundt 80 % av matproduktene inneholdt HMF, hvor instant kaffe hadde det høyeste nivået av HMF. Studien viste at kaffe er en av de viktigste kildene til HMF, ikke bare på grunn av det høye nivået, men også på grunn høyt konsum. Andre viktige HMF kilder var melkeprodukter, juice og brød. Det gjennomsnittlige HMF inntaket ble beregnet til 5,56 mg per dag, og det henholdsvis laveste og høyeste inntaket ble beregnet til 0,01 mg per dag og 32,6 mg per dag. Dette var noe lavere HMF inntak enn rapportert i en tidligere studie (Glatt H. 2006).

1.1.2 HMF dannelse under varmebehandling av mat

HMF dannes i Maillard reaksjonen når reduserte sukker, som for eksempel glukose, varmes opp under tilstedeværelsen av aminosyrer eller proteiner. I tillegg kan stoffet dannes ved direkte termal dehydrering av fruktose, sukrose og i noe mindre grad glukose. Aminosyrer trenger da ikke å være tilstede, og reaksjonen forsterkes under sure forhold (Glatt H. 2006).

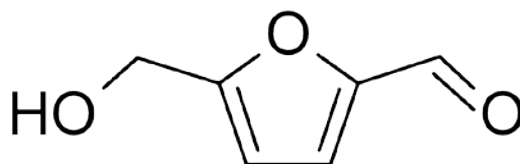
Det først trinnet i dannelse av HMF i Maillard reaksjonen er kondensering av karbonylgruppen fra et redusert sukker med en fri aminogruppe fra en aminosyre eller et protein (Figur 1). Særlig reagerer den positivt ladete ϵ -aminogruppen til lysin med karbonylgruppen til sukkeret. Dette skjer ved at aminet går til nukleofilt angrep på C_1 og et hydroksylion blir eliminert (A i Figur 1). Deretter vil enolisering ved eliminering av hydrogenatomet på C_2 danne 1,2-enaminol, som igjen vil resultere i en ustabil Schiff base, spontant re-arrangeres og danner det stabile Amadori re-arrangeringsproduktet (ARP). ARP

kan degraderes ved lav vannaktivitet til blant annet 3-deoksyson og 1-deoksyson (B i Figur 1). HMF dannes ved at ARP degraderes via 1,2 enolisering. Under denne reaksjonsveien vil en kortvarig positiv ladning skifte likevekta til enolform, som fører til eliminering av hydroksylgruppen ved C₃, som gir 2,3-enol. Videre hydrolysering ved C₁ Schiff basen gir glykosulose-3-en, som igjen cyclodehydreres og HMF dannes (C i Figur 1)(Morales 2008).



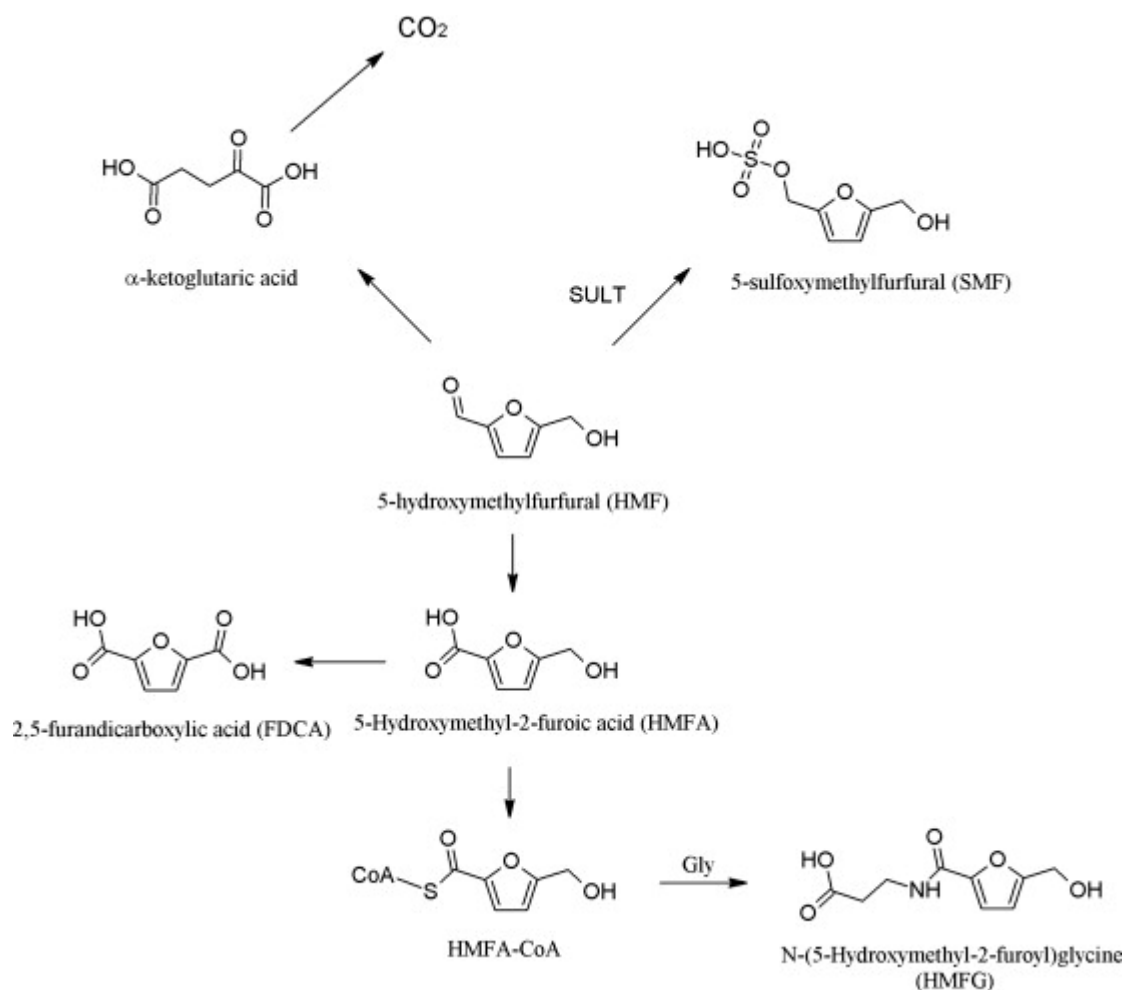
Figur 1: Dannelsen av HMF via Maillard reaksjonen under varmebehandling av mat. Figur A viser første reaksjonstrinn hvor karbonylgruppen til glukose reagerer med en fri aminogruppe i et protein eller aminosyre. Figur B viser enoliseringsreaksjonen som til slutt gir HMF. Strecker reaksjonsprodukter dannes ved lav vannaktivitet (figur C). Figur er hentet fra sciencedirect.com

1.1.3 Biotransformasjon



Figur 2: 5-hydroksymetylfurfural, hentet fra [opensourceecology.org](https://opendatacommons.org/licenses/by/4.0/)

HMF består av en furan ring med to strukturelle grupper, α , β -umettet karbonylgruppe og en allylisk hydroksylgruppe (figur 2). Dette gir HMF egenskaper som kan være både genotoksiske og karsinogene. Ring oksidering og åpning har ikke blitt observert, og det er kanskje fordi alkohol og aldehyd gruppen er enkle mål for biotransformasjon, og sterisk hindrer angrep på ringen. Gruppene kan derimot konverteres til hverandre ved alkohol dehydrogenase, og dermed kan HMF metaboliseres til en symmetrisk bis-aldehyd eller et symmetrisk bis-alkohol (Glatt H. 2006). Hovedmetaboliseringen av HMF skjer ved oksidering av aldehydgruppen, etterfulgt av konjugering av den resulterende karboksylsyren, HMFA, med glycin (Figur 3). Dette gir 5-hydroksymetyl-2-furoyl-glycin (HMFG), som lett skilles ut i urinen. Oksidering av HMF til 2,5-furandikarboksylsyre (FDCA) skjer i større grad når det er lite glycin tilstede (Morales 2008). HMF er et godt substrat for sulfotransferaser (SULT), og kan omdannes til 5-sulfoksymetyl-2-furfural (SMF) som er kjemisk reaktiv forbindelse (Figur 3). Sulfatgruppen hos SMF kan spontant kløyves av, og det resulterer i et reaktivt kation som resonans stabiliseres. SMF kan danne kovalent binding med proteiner og DNA, og kan derved være genotoksisk. SMF kan også reagere med mercaptursyre. SMF har kort levetid og derfor er stoffet vanskelig å måle i biologiske prøver. Som et aldehyd kan HMF danne Schiffs baser med aminogrupeer, for eksempel i proteiner, og reaksjonen er reversibel så fremt stoffet ikke gjennomgår ytterligere reaksjoner (Glatt H. 2006).



Figur 3: Biotransformasjon av HMF. Øverst til høyre er det en sulferingsreaksjon hvor SULTer med 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfat (PAPS) som sulfatdonor gir SMF. HMF oksidering og videre glycin konjugering av karboksylsyren 5-hydroksymetyl-2-furoic acid (HMFA) gir N-(5-hydroxymetyl-2-furoyl)glycin (HMFG) som lett skiller ut i urinen. Den siste ruten er oksidering av HMF til 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA). En rute som er mer vanlig når det er lite glycin tilgjengelig (Morales 2008). Figur hentet fra sciencedirect.com.

1.1.4 Toksisitet

Det har blitt utført mange forsøk for å studere toksisiteten av HMF, og flere studier har fokusert på om HMF kan være genotoksisk og kreftfremkallende.

Janzowski, Glaab et al. (2000) konkluderte med at HMF har et svakt genotoksisk og mutagent potensiale *in vitro*. Tatt i betraktning de høye konsentrasjonene av HMF brukt i forsøket sjeldent vil gjenspeile humant inntak av HMF, med mindre man konsumerer store mengder svsker eller plommejuice, ble det også konkludert at HMF inntak ikke medfører en helserisiko for mennesker. Videre har Svendsen, Meinel et al. (2011) utført et eksperiment for å se om ekspresjonen av human SULT1A1 og 1A2 i tarmen til FVB Min mus ville øke den karsinogene effekten til HMF i tarmen, men konkluderte med at antallet tumorer ikke hadde en signifikant økning i transgene mus med human SULT.

HMF har blitt vist å øke antall mikro adenomaer (Archer, Bruce et al. 1992) og aberrant crypt foci (ACF) i tarmen til mus (Bruce, Archer et al. 1993; Zhang, Chan et al. 1993).

En studie utført av Bauer-Marinovic (2012) påviste noen toksiske effekter av HMF, men det først ved 536 mg/kg dag. Det ble påvist økt tumordannelse i muse hud ved HMF behandling, etter bruk av 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetat som promotor (Surh and Tannenbaum 1994).

1.2 Andre furanderivativer

Furan brukes som et intermediat under syntese og produksjon av forskjellige lineære polymerer (1993). Furan dannes ved oppvarming i matvarer som kaffe, hermetisk mat og mat som oppbevares på glass, inkludert babytmat som inneholder kjøtt og enkelte grønnsaker. Stoffet passerer enkelt biologiske membraner og tas lett opp fra lungene og tarmen. Nøyaktige mekanismer for furan metabolisme vet man ikke, men det involverer blant annet CYP-P450, og cis-2-butene-1,4-dial er sannsynligvis hovedmetabolitten (Lu, Sullivan et al. 2009).

Furan er cytotoksisk i leveren og stoffet er også påvist å være karsinogent i lever hos smånagere (EFSA 2004).

Furfuryl alkohol-baserte resiner brukes som bindingsagenter i støpesand og som korrosjonsinhibitorer i blant annet sement. Stoffet er svært varmeresistant. Det absorberes lett via lungene og i respirasjonsveiene hos rotter og mus, og metabolitter skilles hovedsakelig ut gjennom urinen. Hovedmetabolitten detektert i urinen er furoylglycine. In vivo genotoksisitet tester som micronuclei, kromosomale endringer og søsterkromatid utvekslinger i benmarg var alle negative. Det har derimot blitt påvist at furfuryl alkohol er mutagent i *Salmonella typhimurium*, TA100, som er lagd for å uttrykke sulfotransferase 1A1. Man tror at stoffet omdannes til 2-sulfo-oxymetylfuran som er en elektrofil som kan reagere med DNA (Monien, Herrmann et al. 2011).

Furfural omdannes til furfuryl alkohol av enteriske bakterier. Absorberes lett via fordøyelsessystemet, og omtrent alt skilles ut via urinen i løpet av 24 timer. Stoffet er påvist å ha hepatotoksisk virkning på mus. I tillegg er det vist å være genotoksisk på pattedyrceller i kultur, men i pattedyrceller in vivo var det negativ effekt (1990).

1.3 Humane cytosole sulfotransferaser

Som nevnt tidligere under biotransformasjonskapittelet, kan HMF omdannes til SMF, og det skjer via cytosole sulfotransferaser, SULTer.

Totalt elleve ulike SULT former har blitt karakterisert ved gen, mRNA og protein nivå. Ytterligere to mulige *SULT* gener er identifisert i det humane genomet (Teubner, Meinel et al. 2007). Med tanke på substrat spesifisitet og lokalisering i vev, har man størst kjennskap til

SULT1A1 detektert i hjernen og leveren, SULT1A3 lokalisert i hjernen og blodplater og SULT2A1 detektert i leveren (Glatt, Boeing et al. 2001).

Videre kan SULT formene deles inn i alleler, hvor noen varianter er påvist å være mer effektive i å aktivere promutagener enn andre. Dette kan påvirke hvor følsom man er for toksisiteten av ulike stoffer (Meinl, Meerman et al. 2002). Et eksempel er SULT1A2, lokalisert i leveren, som består av 13 ulike alleler (Glatt, Boeing et al. 2001).

SULT overfører sulfat fra kofaktoren 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfat (PAPS) til nukleofilgrupper hos substratene. Overføringen av et sulfat til små molekyler øker vanligvis vannløseligheten og minker deres passive penetreringer gjennom cellemembraner, noe som er til hjelp for å få skilt molekylet ut gjennom urinen. Derfor blir sulfonering gjerne assosiert med inaktivering og detoksifisering (Glatt, Boeing et al. 2001).

Omdannelsen av HMF til SMF via SULT enzymer er derimot en aktivering, ettersom SMF er påvist å være akutt toksisk (Glatt H. 2006) og er trolig genotoksisk (Surh, Liem et al. 1994). Selv lave doser SMF kan være dødelig for forsøksmus (Bauer-Marinovic, Taugner et al. 2012).

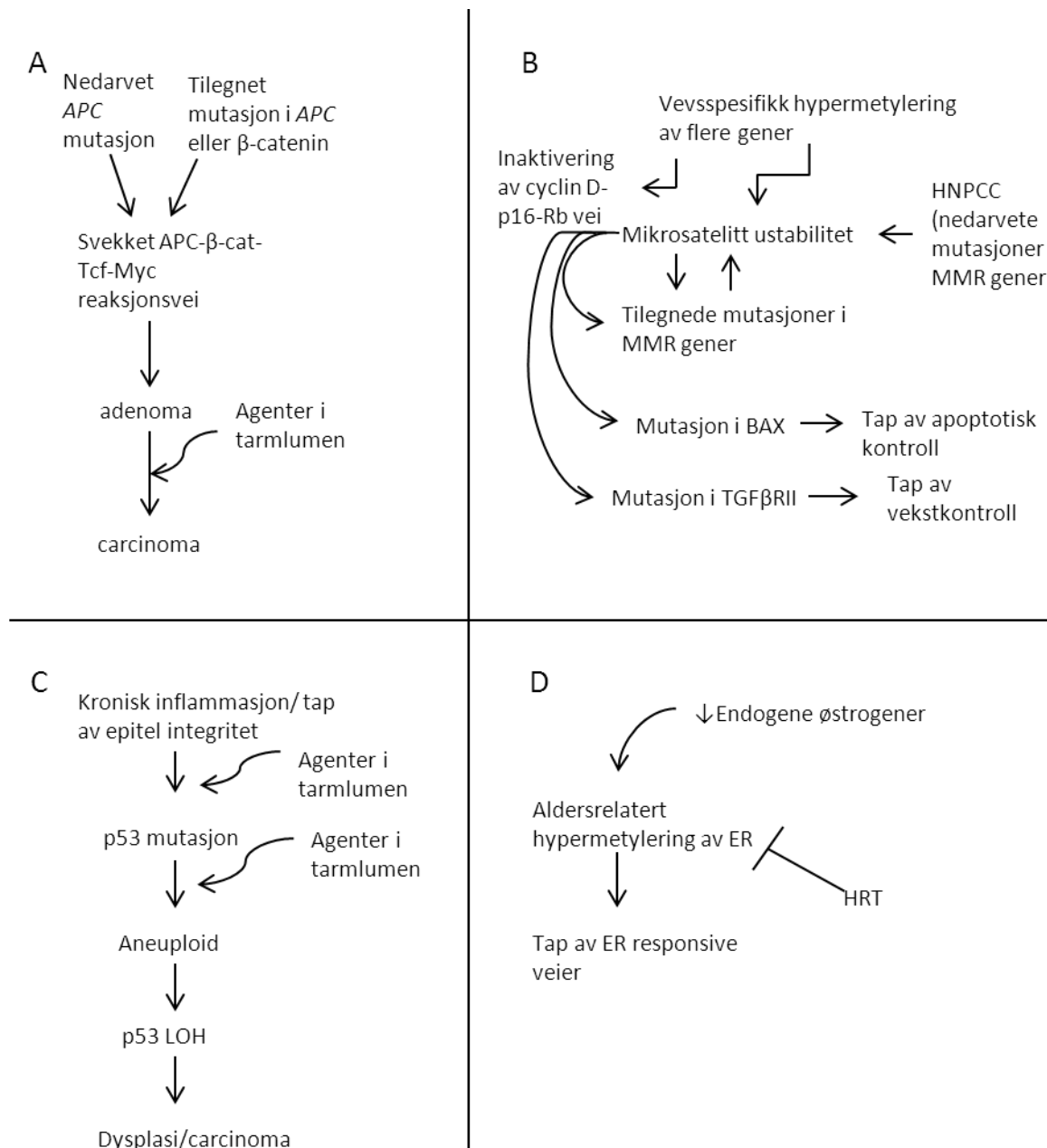
1.4 Tarmkreft

I 2008 døde over 7,6 millioner mennesker av kreft på verdensbasis. Tarmkreft, som er blant de mest vanlige kreftformene i verden, inkludert Norge, sto for 608 000 av disse dødsfallene.

Blant menn er tarmkreft den tredje mest vanlige kreftformen, og blant kvinner er det den andre mest vanlige kreftformen (WHO 2012). I Norge i perioden 2005-2007 var 62 % av de

som fikk påvist tarmkreft fremdeles i live fem år etter at sykdommen ble konstatert (kreftforeningens-blogg.no 2010).

Det er mange ulike faktorer som fører til utviklingen av tarmkreft, deriblant kostholdet vårt. Mange studier påpeker kjøtt, og særdeles godt stekt kjøtt som en risikofaktor for tarmkreft (Xu, Yu et al. 2012). Andre studier viser at høyt fettinnhold i maten, redusert aktivitet, stor kroppsmasse, røyk og alkohol også kan gjøre en mer disponert for å utvikle sykdommen (Gingras and Béliveau 2011). Kalsium og paracet derimot er påvist å redusere sjansen for å utvikle tarmkreft (Sun, Zhu et al. 2012). Uansett hvilke faktorer som leder til sykdommen, er det generelt fire reaksjonsveier som baner vei for en ukontrollert cellevekst, som igjen kan føre til tarmkreft (Figur 4). APC- β -catenin-Tcf-myc reaksjonsveien (Figur 4A), arvelig ikke-polypose tarmkreft (HNPCC) veien (hvor evnen til å reparere DNA feilinkorporering svikter og fører til mikrosatellitt ustabilitet i tumorene) (Figur 4B), ulcerative colitis dysplasia-carcinoma sekvens (Figur 4C) og silencing av østrogen reseptor (Figur 4D). Mutasjoner i APC genet er den reaksjonsveien som vil bli fokusert på i denne oppgaven (Potter 1999).

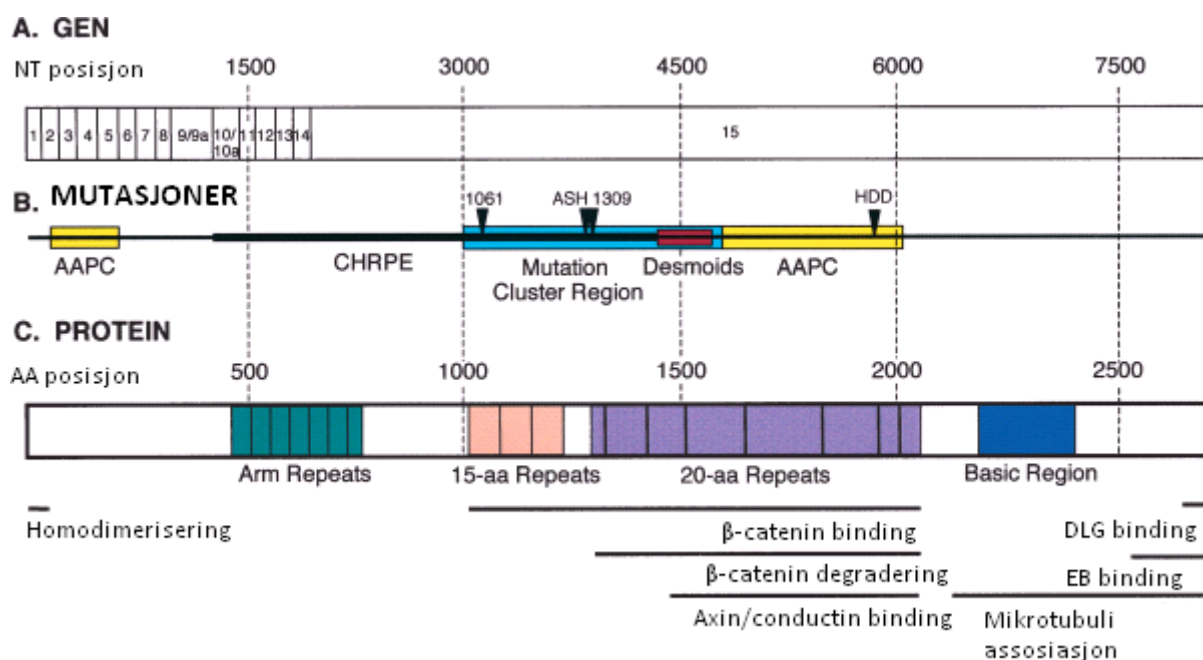


Figur 4: Fire veier for utvikling av tarmkreft: (A) APC- β -catenin-Tcf-myc reaksjonsveien, (B) arvelig ikke-polypose tarmkreft (HNPCC) veien, (C) ulcerative colitis dysplasia-carcinoma sekvens og (D) silencing av østrogen reseptor. Figuren er hentet fra: <http://jnci.oxfordjournals.org/content/91/11/916.full>

1.5 Adenomatøs polypose coli (APC)

1.5.1 APC genet- plassering i genomet og oppbygning

APC er et tumorsuppressorgen som undertrykker tumor dannelse. Genet som koder for APC proteinet er lokalisert på kromosom 5. Den kodende delen er på 8535 basepar og delt inn i 15 eksoner, hvor ekson 15 er det største og består av omtrent $\frac{3}{4}$ av sekvensen (Goss and Groden 2000) (Figur 5A). mRNAet er 10719 basepar langt, består av 16 eksoner, og koder for et protein bestående av 2843 aminosyrer (Half, Bercovich et al. 2009) (Figur 5C). Proteinet er lokalisert i plasma og kjernen (Narayan and Roy 2003), og proteinpartnerne har ulike bindingssetene på APCs (Figur 5C). De fleste mutasjonene i APC genet oppstår i mutation cluster regionen (MCR) (Figur 5B).



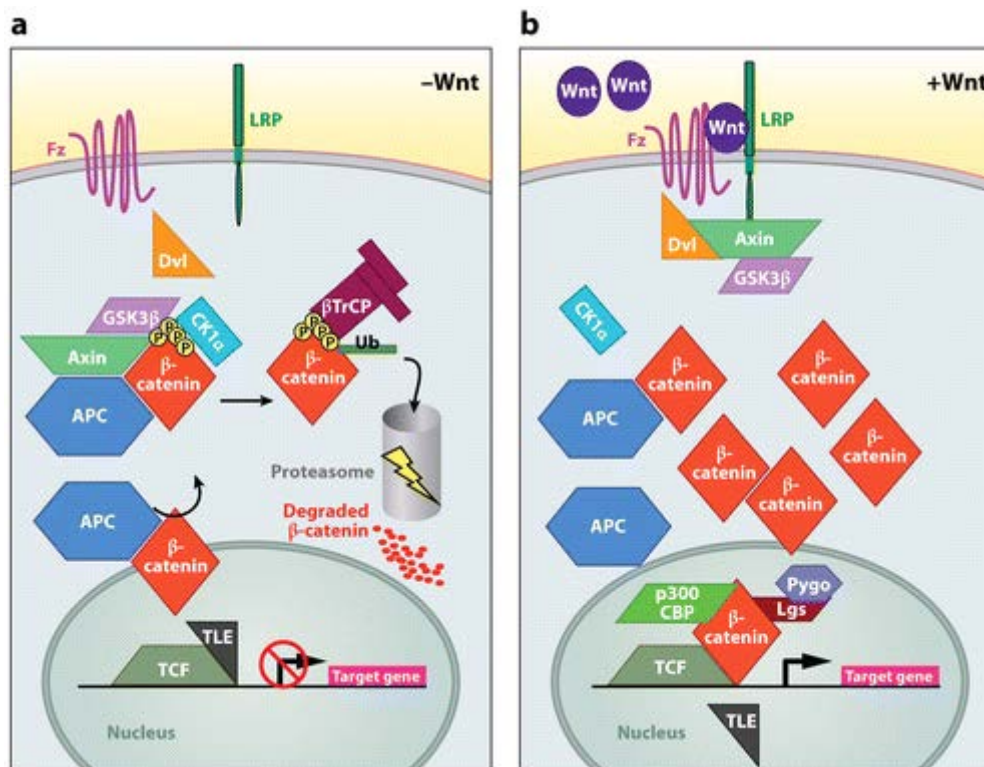
Figur 5: APC genet, mutasjoner som kan oppstå og APC proteinet. (A) APC genet på 8535 bp bestående av 15 eksoner, (B) kjønnsellemutasjoner assosiert med AAPC ved 5' og 3' endene av genet og (C) APC proteinet på 2843 residuer, hvor bindingsregioner for APC proteinpartnere også vises.

Figur hentet fra: <http://jco.ascopubs.org/content/18/9/1967.long>

1.5.2 APCs mekanisme for undertrykkelse av svulstutvikling

APC er et protein som undertrykker tumor utvikling ved å regulere degraderingen av β -catenin i Wnt signaliseringen.

Ved fravær av et Wnt ligand signal, vil APC binde seg til Axin og danne et kompleks med casein kinase 1 α (CK1 α), glykogen syntase kinase 3 β og β -catenin. Dette fører til fosforylering av β -cateninet ved konserverte serine og threonine residuer i den N-terminal delen av proteinet. Et F-box protein β -transducin repeat-containing protein (β TrCP) gjenkjenner motivet, som sender β -cateninet til ubiquitinerings og degradering (Fearon 2011) (Figur 6a). Ved binding av Wnt liganden til reseptorkomplekset frizzled og LRP5/6 får man en inhiberende effekt på GSK3 β og Axin via Dishevelled (Dvl) og β -catenin akkumulerer. Dermed kan β -catenin entre kjernen og virke som en transkripsjonsaktivator og aktivere gener med TCF DNA-bindingssteder (Fearon 2011). Dette inkluderer blant annet proto-oncogener som cellesyklus regulatoren c-myc, det G1/S-regulerende cyclin D1, genet som koder for den matrix degraderende proteinasen, matrysin, AP-1 transkripsjonsfaktorene c-jun og fra-1 og et urokinase type plasminogen aktivator reseptor gen (Narayan and Roy 2003). Ved inaktiverte APC alleler vil man få samme effekt som når Wnt liganden er tilstede, dvs akkumulering av β -catenin og aktivering av gener (Figur 6b) (Fearon 2011).



Figur 6: APCs mekanismer for undertrykkelse av svulstutvikling via Wnt signalveien. a viser β -catenin degradering ved fravær av wnt ligand, og b viser β -catenin akkumulering ved wnt ligand tilstedeværelse og påfølgende aktivering av gener. Hentet fra http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-pathol-011110-130235?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&

1.5.3 APC er involvert i aktin cytoskjelett integritet, celle-celle adhesjon og celle migrering

APC har andre oppgaver i tillegg til nedregulering av β -catenin. Dette inkluderer organisering av celle-celle adhesjon og cytoskjelett proteiner i epitel celler. Muterte APC proteiner er også vist å føre til dårligere bevegelse av celler langs krypt vili aksene (Narayan and Roy 2003).

1.5.4 Familiær adenomatøs polypose (FAP)

Familiær adenomatøs polypose (FAP) er en sjelden autosomal dominant nedarvet syndrom, forårsaket av en mutasjon i APC genet, og karakteriseres av en utvikling av hundrevis til tusenvis av adenomer i rektum og tykktarmen i løpet av to tiår (Half, Bercovich et al. 2009). På grunn av det store antallet adenomer vil mest sannsynligvis noen av dem utvikles til å bli

ondartede svulster. Det er ikke uvanlig at adenomer og adenokarsinomer manifesterer seg i andre områder enn tykktarmen, som for eksempel magesekken og bukspyttkjertelen. I tillegg er det mer enn 90 ganger høyere risiko for å utvikle medulloblastoma, en svært ondartet hjernesvulst, for FAP pasienter enn for normale individer (Goss and Groden 2000). Generelt vil FAP individer ha utviklet kreft omtrent ti år etter at polyppene oppsto, det vil si ca. 40-50 års alderen (Half, Bercovich et al. 2009). Trass i at FAP er en arvelig sykdom, er 25-30 % av FAP tilfellene «de novo» kjønnselle mutasjoner, uten noen kjente nedarvingsmønstre. Rundt 0,5 % av alle tarmkreft tilfeller skyldes FAP (Fearon 2011).

1.5.5 Mutasjon i APC genet er et av de første stegene på veien til utvikling av tarmkreft

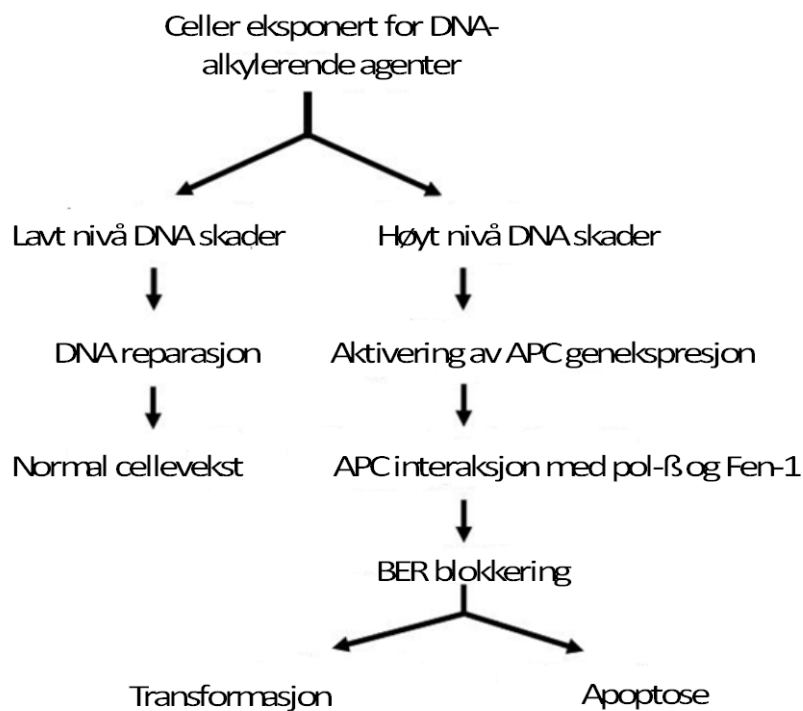
Mutasjoner i *APC* genet er en av de tidligste hendelsene i en flertrinnsprosess på veien til utvikling av tarmkreft. Rundt 60-80 % av sporadiske tarmkreft og adenoma tilfeller inneholder mutasjoner i *APC* genet og blant FAP pasienter er tap av heterozygositet av det andre normale *APC* genet vanlig. Påfølgende kromosomal ustabilitet og mutasjoner i *K-ras* og *p53* observeres ofte under kreftutviklingen (Narayan and Roy 2003).

1.5.6 Stadfestelse av sykdomsfenotype ved lokalisering av APC mutasjon

Man kan bruke lokaliseringen til *APC* mutasjonen for å predikere sykdomsfenotypen. For eksempel er mutasjoner mellom basene 3747 og 3990 assosiert med en fenotype der man kan utvikle over 5000 svulster, mens mutasjoner nær 5' eller 3' enden gir en fenotype med generelt færre enn 1000 adenomer. Mutasjoner helt i 5'enden av genet resulterer i adenomatøs polypose coli syndrom (AAPC) karakterisert ved at færre enn 100 adenomer utvikles senere i livet (Goss and Groden 2000).

1.5.7 Betydningen av APC i DNA reparasjon

DNAet blir stadig utsatt for skader og muligheten til å kunne reparere disse skadene er essensiell for unngå kreftutvikling. En av typene skader som oppstår er oksidative skader, som 8-oxo-Gua, noe som fører til en G:C→T:A transversjon (Marnett 2000). Base excision repair (BER) er hovedveien for reparasjon av denne typen endringer og kan deles inn i ytterligere to veier, single nukleotid BER/short patch (SP) og multinukleotid BER/long patch (LP). Et av BER proteinene, polymerase- β (pol- β), blir blokkert av APC ved LP-BER uten å påvirke SP-BER (Narayan, Jaiswal et al. 2005). Et annet BER protein, flap endonuklease 1 (Fen-1), får sin 5'-flap endonuklease og 3'-5' eksonuklease aktivitet blokkert av APC. Et DNA reparasjon inhiberings (DRI)-domene lokalisert ved N-terminal regionen til APC fungerer som interaksjonsstedet mellom APC og Pol- β og Fen-1. Denne plasseringen gjør at domenet spares for mutasjonene som oppstår i MCR, ettersom denne regionen er mer sentralt plassert i *APC* genet, og dermed vil et mutert APC protein fremdeles kunne modulere BER aktiviteten. Konsekvensen av interaksjonen mellom APC og BER kan være enten forsterket alkyleringsindusert karsinogenese eller apoptose ved store nok DNA skader (Figur 7) (Jaiswal and Narayan 2008).



Figur 7. APC og DNA reparasjon via base excision repair (BER): Ved høye nivå DNA skader grunnet DNA-alkylerende agenter aktiveres APC genekspressjon, som fører til APC proteinet interaksjon med pol-β og Fen-1, BER blokkering og apoptose eller transformasjon.

Små DNA skader reparerer og cellen har normal cellevekst. Hentet fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585005/figure/F4/>

1.6 Musmodeller- Bruk av transgene musmodeller i testing av genotoksisitet

1.6.1 Multiple intestinal (Min) mus

Min mus er en god modell for studier av tykktarmskreft. Musene har et nedarvet mutert Apc gen som gjør at polypper utvikles spontant i tarmen. Min mus lever sjeldent lengre enn 120 dager. Apc mutasjonen ble oppdaget ved Wisconsin universitet ved fenotypisk screening etter tilfeldige kjønscellemutasjoner etter at musene var behandlet med etylnitrosourea. Det er en autosomal dominant heterozygot nonsense mutasjon i Apc genet, og gjør om kodon 850 fra

leucin (TTG) til et stopp kodon (TAG). Dette er homologt med APC mutasjoner i kjønnscellene til mennesker med FAP eller som oppstår tilfeldig i størstedelen av sporadiske tarm adenomer (Jacoby, Marshall et al. 1996).

Forskjellen mellom mennesker og Min mus er at Min mus stort sett utvikler adenomene i tyntarmen, mens hos mennesket oppstår de hovedsakelig i tykktarmen og endetarmen (Goss and Groden 2000).

1.6.2 LacZ plasmid mus

I dag eksisterer det mange ulike transgene musmodeller laget for å måle genotoksisitet i ulike vev. Disse kan deles inn i to kategorier avhengig av skyttelvektoren som er tatt i bruk, det vil si bakteriofag lambda eller plasmid. Videre kan de deles inn etter bruken av ulike typer reporter gen. Et av de mest vanlige reporter genene er LacZ. (Dolle, Snyder et al. 1999).

LacZ plasmid musen inneholder rundt 20 kopier per haploid genom av det 5kb lange plasmidet pUR288, som inneholder det 3100 kb lange LacZ genet, integrert i flere kromosomer i C57BL/6 musen. Muselinje 60 har plasmidet integrert i kromosom 3 og 4 (Lambert, Singer et al. 2005). Linje 30 mus har pUR288 plasmider ved ett integreringssted på kromosom 11 (Dolle, Snyder et al. 1999).

Denne plasmid baserte LacZ modellen har flere fordeler over den bakteriofag baserte LacZ modellen (Muta-musen). For det første siden plasmidet er ca 1/10 av størrelsen til bakteriofagen kan mange identiske kopier av de samme sekvensene i plasmidene effektivt bli isolert fra genomisk DNA med høy effektivitet. Dette står i kontrast til den bakteriofage baserte metoden der genomisk DNA med høy molekylær vekt må isoleres for å få vektorer med høy effektivitet. For det andre kan en rekke slettinger oppstått inni en serie med LacZ

sekvenser i tillegg til slettinger som strekker seg fra LacZ genet inn i 3'flanking kromosomale sekvenser redde ut, detekteres og karakteriseres ved LacZ plasmid modellen. Bakteriofage baserte metoder derimot er ikke effektiv når det gjelder å detektere mutasjoner med slettinger, og spesielt ikke dersom disse slettingene strekker seg inn i eller gjennom sekvenser nødvendig for profage propagering. Den bakteriofag baserte musemodellen er derfor ikke egnet til å detektere mutagene stoffer som gir størrelsesendringer i DNA (Lambert, Singer et al. 2005).

1.7 Oksidative skader i DNA

Reaktive oksygen radikaler (ROS) dannes kontinuerlig i kroppen som en konsekvens av enten biokjemiske reaksjoner eller ytre faktorer, og man tror disse radikalene er involvert både i utviklingen av kreft og aldringsprosessen (Loft and Poulsen 1996).

Kilder til ROS inkluderer superoksid anion radikalet $O_2^{\cdot-}$, et biprodukt (1-5 %) under mitokondriell respirasjon. Radikalet har lav reaktivitet, men kan reduseres til hydrogen peroksid (H_2O_2). H_2O_2 kan ved tilstedeværelsen av jern og kobber hydrogen peroksid, omdannes til hydroksyl radikaler (OH^{\cdot}), som er den mest skadelige typen ROS (Loft and Poulsen 1996). Faktisk er OH^{\cdot} så reaktiv at det diffunderer ikke mer enn en eller to molekylære diametere før det reagerer med en cellulær komponent. Dermed må HO^{\cdot} være i umiddelbar nærhet av DNAet for å kunne oksidere nukleinsyrer. Peroxynitritt ($ONOO^{\cdot}$), er et produkt dannet ved kobling av nitrisk oksid og superoksid, og er også en ekstremt sterk oksidant (Marnett 2000). Inhalering av røyk og forurensset luft i tillegg til mat er eksempler på kilder som inneholder ROS eller forbindelser som genererer ROS under ko-oksidering/metabolisme. Nitrogenoksid er også et fritt radikal som dannes av fagocytter i tillegg til å være en neurotransmitter og vaskulært avslappende. I tillegg er også ioniserende stråling og UV lys vist å generere ROS (Loft and Poulsen 1996).

ROS kan angripe hvilken som helst cellulær struktur eller molekyl, inkludert DNA. Oksidative DNA skader inkluderer flere spesifikke oksiderte puriner og pyrimidiner, i tillegg til alkali labile seter og tråd brudd, dannet enten direkte eller under reparasjon. C-8 hydroksylering av guanin, som gir 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanosin (8-oksodG), er den mest studerte formen for oksidativ modifisering av DNA. Eksempler på andre modifiseringer er 8-oksoadenin, 2-hydroksy adenin, Fapy adenin, 5-hydroksymetyluracil, 5-hydroksycytosin, cytosin glykol og tymin glykol. Andelen av de ulike DNA modifiseringene avhenger i stor grad av typen reaktiv oksygen radikal involvert. Superoksid radikalet $O_2^{\cdot-}$ har for lav reaktivitet til å gi noen former for DNA modifisering, mens derimot hydroksyl radikaler ($OH\cdot$) føre til mange ulike DNA modifiseringer. Singlett radikaler (1O_2) induserer stort sett 8-oksodG (Loft and Poulsen 1996).

Selv om alle basene er utsatte for skader generert av radikaler, er det som oftest kun GC par modifiseringer som fører til mutasjoner. I tillegg oppstår mutasjonene gjerne i «hot spots» og består stort sett av basepar substitusjoner. Hydroksyl radikaler fra ioniserende stråling induserer hovedsakelig GC til CG eller AT substitusjoner. Singlett oksygen og 1,2 dioksetaner induserer oftest 8-oksodG og GC til AT basepar substitusjoner. Altså er det hovedsakelig modifisert guanin, som 8-oksoguanin, som feilaktig får adenin inkorporert, som fører til mutasjoner (Loft and Poulsen 1996). Forsøk har også vist at 8-oksoadenin, tymin glykol, 5-hydroksyuracil og uracil glykol er mutagene, og da særlig de to sist nevnte (Marnett 2000).

1.8 Aldehyd metabolisme og toksisitet

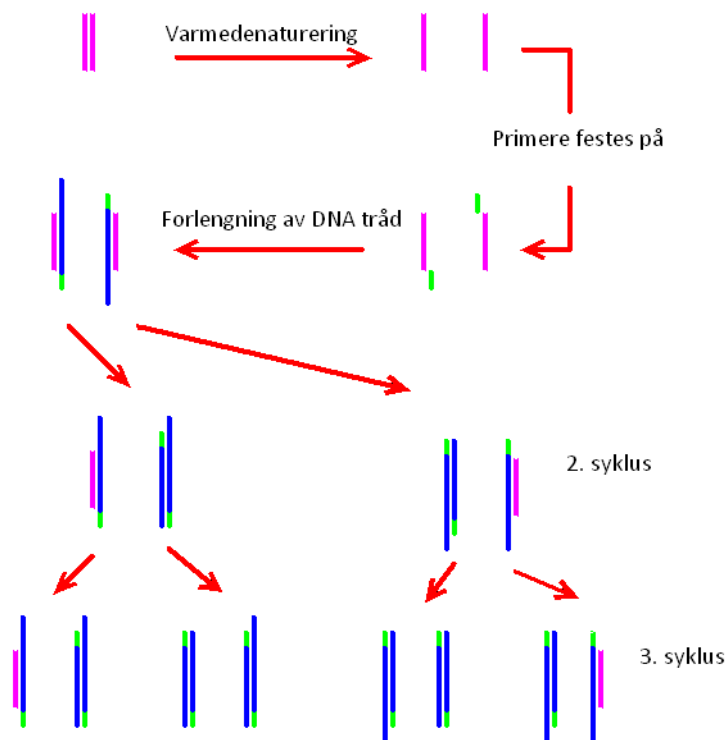
Aldehyder er reaktive elektrofiler som kan danne addukter med cellulære protein tioler og aminer, og dermed også føre til toksisitet. I tillegg kan aldehyder danne addukter med DNA og modifisere det, noe som fører til mutagenisitet (O'Brien, Siraki et al. 2005). Når karbon 2 og 3 (α og β) har en dobbeltbinding blir aldehydet enda mer reaktivt. Disse konjugeres oftest av glutation (Feron, Til et al. 1991). Metabolisering og detoksifisering av aldehyder avhenger av både aldehydet og cellens innhold av aldehyd-metaboliserende enzymer. Eliminering av alkanaler og aromatiske aldehyder skjer via oksidering katalysert av dehydrogenaser. Det fins nitten klasser aldehyd-metaboliserende enzymer hvor ni av dem er aldehyd oksiderende, syv er aldehyd reduserende og tre er glutation avhengige enzymer. Innenfor gruppen aldehyd oksiderende enzymer er blant annet aldehyd dehydrogenase familien, som er lokalisert i lever og som fører til en irreversibel oksidasjon. Aldehyd reduserende enzymer inkluderer alkohol dehydrogenaser, aldo-keto reduktaser og kort-kjedete dehydrogenaser/reduktaser. En stor andel av disse befinner seg også i leveren. Blant glutation avhengige enzymer har vi ADH5, GSTer og glyoksalase I (O'Brien, Siraki et al. 2005).

1.9 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode som brukes for å eksponentielt syntetisere nye DNA tråder komplementære til en templat tråd, som vist i figur 8. Det er altså en måte å kopiere og forsterke signalet fra DNA sekvensen. Dermed kan PCR blant annet brukes til å diagnostisere sykdommer og til å screene biblioteker for kloner med spesifikke DNA fragmenter (Wages Jr 2005).

For å kunne gjennomføre en PCR må man ha et DNA templat som er utgangspunktet for DNA amplifikasjonen. DNA polymerase er et enzym som adderer nukleotider til den eksisterende DNA tråden og Taq polymerasen som tåler opp til 95 °C er den mest kjente. En

primer som er komplementær med deler av DNA sekvensen trenges også, fordi DNA polymerasen krever en eksisterende 3'-OH gruppe for å kunne plassere det første nukleotidet og nukleotider (dNTPer) (Wages Jr 2005).

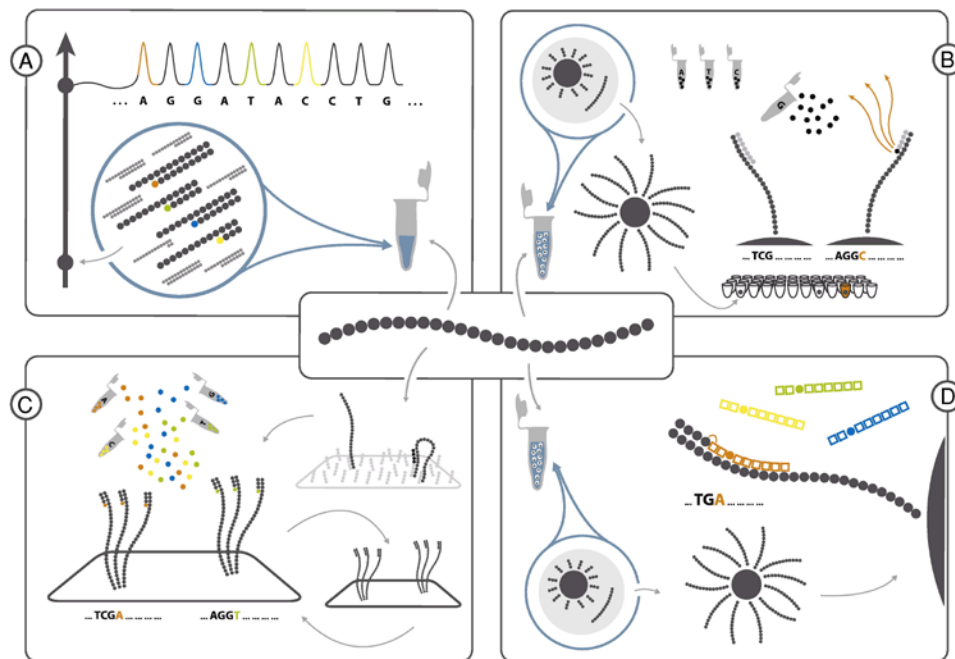


Figur 8: Polymerase kjedereaksjon (PCR). Først separeres DNA trådene fra hverandre ved oppvarming mellom 94-96 °C. Deretter senkes temperaturen til det optimale for at primerne skal binde seg. Etter det kan en ny DNA tråd syntetiseres på hver av de originale trådene ved hjelp av DNA polymerase under optimal temperatur og med nukleotider tilstede. Figur hentet fra www.web-books.com

1.10 DNA sekvensering

DNA sekvensering brukes for å finne rekkefølgen av nukleotider i en DNA sekvens, og kan blant annet brukes til å finne endringer i en DNA sekvens, f. eks en mutasjon, forårsaket av et kjemikalie. Ulike sekvenseringsmetoder er vist i figur 9. Den metoden som er brukt i denne masteroppgaven er sekvensering ved kjedeterminering (Figur 9A). Man har da DNA primere,

enkelt trådede DNA templater man ønsker å sekvensere i en løsning med deoksynukleotid trifosfater (dNTPer) som festes på DNA tråden av DNA polymeraser. I tillegg har man fluorescens merkede dideoksynukleotid trifosfater (ddNTPer) som mangler en 3'OHgruppe. ddNTPer ute OH gruppe gjør at fosfodiesterbinding ikke kan dannes mellom nukleotidene og fører til en terminering av sekvenseringen. Kun en av de fire ddNTPene tilsettes hver reaksjon. Man ender så opp med DNA templater i mange ulike lengder, som kan separeres ved kapillær elektroforese (Pettersson, Lundeberg et al. 2009).

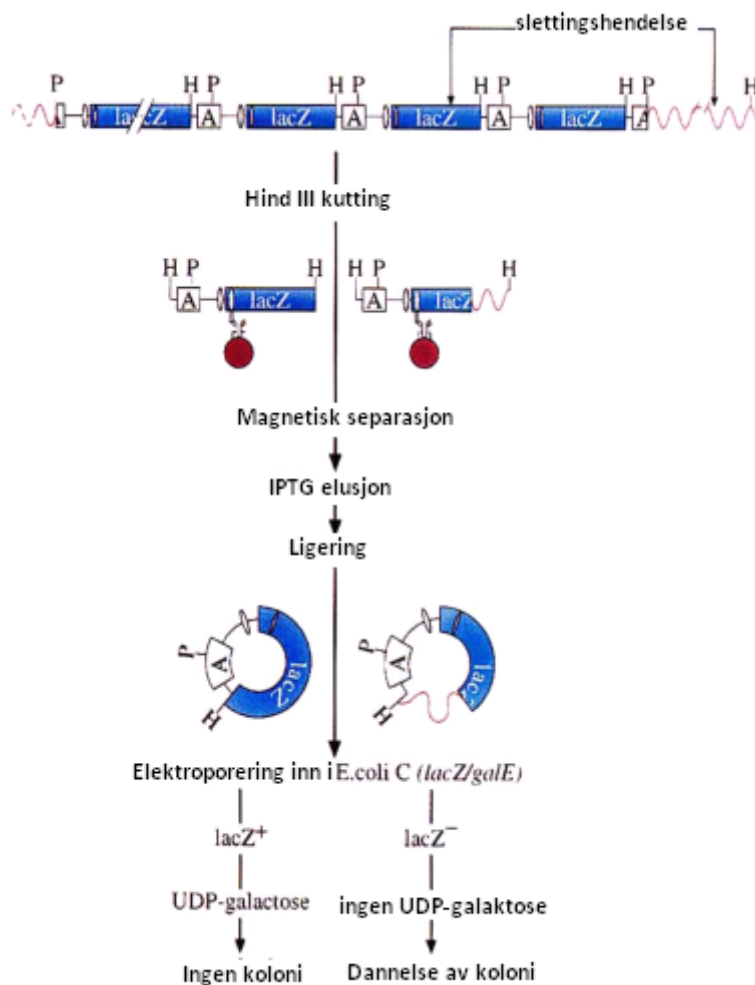


Figur 9: DNA sekvenseringsmetoder A) Kjedeterminering. Man lager en sekvenseringsreaksjon ved å ha en DNA sekvens, dNTPer og ddNTPer, hvor sistnevnte fører til en terminering av sekvenseringen. ddNTPene har en basespesifikk farge. Under sekvenseringsreaksjonen vil man få fragmenter i alle størrelser og disse separeres ved gel eller kapillær elektroforese hvor de merkede basene avslører sekvensinformasjonen ved hver posisjon. B) Miniatyrisert pyrosekvensering. C) Revers terminering. D) Sekvensering ved ligering. (Pettersson, Lundeberg et al. 2009)

1.11 Plasmid isolering og bestemmelse av mutant frekvens

For å studere mutasjoner i LacZ genot fra vevet til en LacZ plasmid mus, så må plasmidet med LacZ isoleres (Figur 10). Plasmider som inneholder LacZ reporter gen, skilles fra musenes genomiske DNA ved hind III restriksjonsenzymkutting og separeres fra totalt genomisk DNA ved å bruke LacI repressor proteiner koblet til magnetiske kuler. Plasmidene liggeres sammen og elektrooverføres inn i E.coli C LacZ⁻, galE⁻ vertsceller. Bakteriene er verts-restriksjons-negative, noe som hindrer degradering av innkommende (metylert) plasmid DNA. GalE er mutert for å kunne positivt selektere ut LacZ mutanter på medium som inneholder laktose analogt P-gal. GalE mutanter lyseres i nærvær av galaktose ettersom de mangler UDP gal 4-epimerase. Dermed er det kun de mutante LacZ⁻ cellene som kan danne kolonier (Boerrigter, Dolle et al. 1995) (Figur 10).

For å avgjøre om et stoff fører til økt mutantfrekvens i mus, så kan mutantfrekvensen bestemmes ved å se på andelen kolonier på p-gal selektive plater i forhold til andelen kolonier på x-gal (ikke selektive) plater ganget opp med fortynningsfaktoren til de transformerte cellene (Garcia, Busuttil et al. 2007). Dette gjøres separat for ulike vev og for ulik behandling.



Figur 10: Isolering av LacZ pUR288 plasmider integrert hode til hale i musegenomet. Hind III enzymet kutter ut LacZ genet og LacI repressor protein koblet til magnetiske kuler separerer det. Deretter ligger plasmidet sammen og elektroporerer inn i *E. coli* bakterier. Figur hentet fra: <http://www.nature.com/nature/journal/v377/n6550/pdf/377657a0.pdf>

1.12 Kilder for artefakter

Det er fins minst tre kilder til artefakter som kan påvirke mutantfrekvensen. Revers mutasjoner i *galE* i tillegg til framover mutasjoner i *galT* eller *galK*¹⁴ gjør at ikke-mutante celler kan vokse på selektivt medium. Med en frekvens på 2×10^{-6} er denne kilden neglisjerbar. En mutantfrekvens på mindre enn 1×10^{-5} ble funnet basert på at elektroporeringsprosessen induserte skader i plasmidet som kunne føre til mutasjoner generert i *E. Coli* under de første replikasjonsrundene. Tilstedeværelsen av Hind III sete nær LacZ mutasjonstarget genet er og en kilde for artefakter, med en frekvens på 1.1×10^{-5} . Dette kan

korrigeres for og vil bli nevnt under metode kapitlet (Boerrigter, Dolle et al. 1995) (se avsnitt 2.5.3 side 37). Ved å bruke PstI under isoleringen av plasmidet istedenfor Hind III, observerte man gjennomsnittlig 30 % lavere mutantfrekvens. Ulempen med å bruke PstI, i motsetning til Hind III, er at kun indre plasmid kopier blir reddet, ikke de nær 3´regionen til musesekvensene. Konsekvensene er at spesielt størrelsesendringer ikke blir registrert.

1.13 Målsetting

1. Undersøke om HMF er genotoksisk *in vivo*, målt ved DNA skader i reportergenet LacZ.
 - a. Undersøke om behandling med HMF gir en signifikant økning i mutantfrekvensen hos LacZ plasmid mus.
 - b. Undersøke om det er en signifikant forskjell på andelen størrelsesendringer i DNAet til LacZ genet hos mus behandlet med HMF.
 - c. Undersøke om det er en signifikant økning oksidative skader i LacZ genet til HMF behandlede mus.
2. Undersøke om mus med nedarvet skade i Apc er mer følsomme for eventuelle DNA skader enn wt mus forårsaket av HMF
 - a. Undersøke om det er en signifikant forskjell på mutantfrekvensen mellom Min mus og wt mus behandlet med HMF.
 - b. Undersøke om det er en signifikant forskjell på andelen størrelsesendringer mellom Min mus og wt mus behandlet med HMF.

2. Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier

Glyserol, (G2025), kanamycin, (K1377) og ampicillin, (A0166) ble kjøpt inn fra Sigma-Aldrich Corporate Offices (St.Louis, MO 63103, USA). Primerne pUR4923-F, pUR3829-R, pUR0366-F, pUR0794-F, pUR1234-F, pUR1671-F, pUR2113-F, pUR2552-F, pUR5268-F og pUR3367-R kom fra Eurofins MWG Operon (D-85560 Ebersberg). Enzymene Aval, R0152L og Hind III, (R0104S) i tillegg til bufferne NEBuffer 4, (B7004S) og NEBuffer 2, (B7002S), ble innkjøpt fra New England BioLabs (Ipswich, MA 01938-2723, USA). Qiagen Hot Star Taq Master Mix Kit, 1000 u, 203445 og QIAprep Spin miniprep kit, 27104, ble hentet inn fra Qiagen GmbH, (40724 Hilden, Germany). FlashGel DNA marker, 100bp-4 kb, 50473 og FlashGel loading dye, 5x concentration, ble kjøpt hos Lonza Group LTD (PO box 4002, Basel, Switzerland). LB-medium lennox, Difco og Bacto Agar, Difco ble innhentet fra Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ USA 07417). Separasjonsgel LPA1(608010), separasjonsbuffer (608012), DTCS quik start kit (608120), Thermowell 96well PCR plate (609801) og kapillær (609801) ble alt kjøpt fra Nerliens-Meszansky AS (Postboks 158 Økern, NO 0509 Oslo)

2.2 Annet utstyr

FlashGel Cassettes 1,2 %, 12+1 single tier (57023), ble også kjøpt hos Lonza Group Ltd (PO box 4002, Basel, Switzerland). Multiplate 96-well (MLP-9601), PCR-plate i tillegg til Biorad icycler, PCR-maskin, ble hentet inn fra Bio-Rad Laboratories Headquarters (Hercules, CA 94547). IKA MS3, ristemaskin, og Boekel replicator, model 140500, 738-0252, ble kjøpt hos VWR International (LLC, Radnor Corporate Center, Radnor, PA 19087, USA). Eppendorf mastercycler PCR-maskin, sekvenseringsmaskinen Beckman CEQ 8000 og CEQ™ Separation Buffer Plates (609844), kom fra Harlow scientific (Arlington, MA 02474). Avlsdiett (Harlan Teklad (E), Harlan Teklad, UK). Vedlikeholdsdiett (SDS RM1 (E), Special

Diets Services Ltd., Witham, UK). Amicon ultra 0,5ml 30K (UFC503096) ble kjøpt hos Millipore (Merck Millipore Headquarters, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821) NucleoSEQ kolonner (M740523250) ble kjøpt fra AH diagnostics (Runetofte 18, DK-8210 Aarhus V). Nanodrop spektrofotometer ND-1000 ble kjøpt hos Thermo scientific (Wilmington, DE 19810, USA) og Gel Logic carestream 212 PRO imaging system kom fra Carestream health (Rochester, NY 14608, USA).

2.3 Dyr

Min musene kom fra Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine 04609, US) og LacZ plasmid musene kom fra The National Institute for Public Health and the environment (RIVM, Nederland).

2.4 Dyreforsøk

Denne oppgaven er basert på en del tidligere utført arbeid og inkluderer dyreforsøket på LacZ mus som ble utført av Camilla Svendsen. Dyreforsøket er kort beskrevet nedenfor.

I forsøket ble det krysset homozygot LacZ plasmid hunn mus med heterozygot C57BL/6J Min hann mus slik at man fikk de to genetiske variasjonene LacZ-Min og LacZ-wt mus. Kun hunn mus ble brukt i forsøket.

Min og wt musene ble identifisert ved en allel spesifikk PCR-assay på DNA isolert fra ørebrusk etter metode utviklet ved avdelingen for vann, mat og kosmetikk ved Nasjonalt folkehelseinstitutt.

Dyrene oppholdt seg i plastbur med 12 timer lys og 12 timer mørke syklus. Vann ble tilført ad libitum. En egen avlsdiett ble gitt til musene var 4 uker gamle. Deretter ble en vedlikeholdsdiett gitt.

2.4.1 HMF injiseringsforsøk

To grupper på fire hunn wt-LacZ og fire Min-LacZ mus fikk kun én subkutan injeksjon HMF på 500 mg/kg kroppsvekt, 3-6 dager etter fødsel. Kontroll mus bestående av fire wt-LacZ og fire Min-LacZ mus per gruppe fikk injisert 0,9 % NaCl. Musene ble så avlivet 14 dager etter fødsel.

2.4.2 HMF sondeforingsforsøk

To grupper på fire 3 uker gamle hunn mus, hvor en gruppe er wt-LacZ mus og den andre er Min-LacZ mus ble tatt i bruk. Disse ble behandlet med 750 mg/kg kv HMF, gitt ved sondeforing 3 ganger i uken i 4 uker. Deretter ble musene avlivet 2 dager etter siste behandling. Kontroll mus også bestående av to grupper á 4 hunner i hver, hvor den ene gruppa var wt-LacZ og den andre var Min-LacZ, fikk 0,9 % NaCl via sondeforing.

2.5 DNA isolering og mutantfrekvensanalyse

Nyre, lever, tynntarm og tykktarm ble høstet inn fra hver mus. Vevene ble skylt med iskald fosfat-bufret saline, overført til Nunc CryoTubes og umiddelbart lagt i flytende nitrogen. Disse ble så lagret ved -80 °C.

Frossent vev ble sendt til The National Institute for Public Health and the environment (RIVM, Nederland) for DNA isolering og mutantfrekvens analyse ble utført av samarbeidspartnere Jan van Benthem og Edwin Zwart. Kun mutante kolonier ble sendt tilbake for videre mutasjonsanalyse og DNA sekvensering.

2.6 Størrelsesendring og ingen størrelsesendring analyse

Alle mutante kolonier ble analysert for å se på andelen kolonier som hadde størrelsesendringer i LacZ genet forhold til de mutante koloniene som ikke hadde størrelsesendringer.

2.6.1 Oppdyrking av LacZ kloner

LacZ klonene ble dyrket opp på et nytt 96 brønners brett og jobbet videre med, slik at man hadde de originale prøvene å gå tilbake til.

Dyrkingsmedium

Flasker à 200 ml ble tilsatt 200 ml dH₂O og 4g Lennox LB-medium for næring, for å få den ønskede konsentrasjonen på 20g/L Lennox LB. Løsningen ble så autoklavert i 20 min, deretter ble 1 flaske fordelt i 20 sterile rør med 10 ml løsning i hver og satt til risting i 3 døgn ved 37 °C for å sjekke steriliteten. Eventuelle blakkede rør ble ansett som forurensede og kastet.

To rør à 10 ml ble hver tilsatt 10 µl 25mg/ml kanamycin, for å få ønsket konsentrasjon på 25 µg/ml og 15 µl 100 mg/ml ampicillin, for å få ønsket konsentrasjon på 150 µg/ml. Deretter ble 150 µl av denne løsningen tilsatt hver brønn i en rundbunnet 96-brønners plate (Garcia, Busuttil et al. 2007).

LacZ kloner

Klonene som lå fryst ved -70 grader celsius ble tatt opp, og delvis tint, liggende på is. En sterilisert boekel replikator ble ført ned i brønnene og deretter direkte i den rundbunnede platen med medium. Deretter ble de originale klonene raskt fryst ned igjen, og platen med klonene ble satt til dyrking i en ristemaskin ved 37 grader for 24 timer. Gitt at dyrkingen var suksessfull gikk man videre til neste steg med å kjøre PCR (Garcia, Busuttil et al. 2007).

2.6.2 PCR amplifikasjon

PCR ble kjørt på alle prøvene for å få amplifisert 4253 basepar av plasmidet, inkludert LacZ genet. Mastermiksen er etter oppskrift fra Garcia, Busuttil et al. (2007). 15 µl mastermiks (Se

Tabell 1) ble fordelt hver brønn i et 96 brønners brett. Primersekvensene, som oppgitt av produsent, er også beskrevet i tabell 2. Klonene ble tilsatt mastermiksen via boekel replikator. Disse klonene ble tilsatt 50 µl 70 % glyserol og fryst ned ved -70 °C

Tabell 1: Beskrivelse av reagenser i mastermiksen for PCR amplifikasjon av 100 prøver.

Reagenser	pr. Prøve	100 prøver
Qiagen hotstar taq MM polymerase	7,5µl	750µl
12,5 uM pUR4923-F primer	0,3µl	30µl
12,5 uM pUR3829-R primer	0,3µl	30µl
ultrarent dH2O	6,9µl	690µl
Total volum	15µl	1500µl

Tabell 2: Beskrivelse av primersekvensene brukt i PCR mastermiks

Primer	Sekvens
pUR4923-F	5' TGG AGC GAA CGA CCT ACA CCG AAC TGA GAT 3'
pUR3829-R	5' ATA GTG TAT GCG GCG ACC GAG TTG CTC TTG 3'

PCR-program

PCR ble kjørt på et program som besto av 15 min denaturering ved 95 °C, etterfulgt av 35 sykluser på 20 sekunder ved 95 °C og 8 minutter ved 68 °C(Garcia, Busuttil et al. 2007).

2.6.3 Restriksjonsenzym kutting

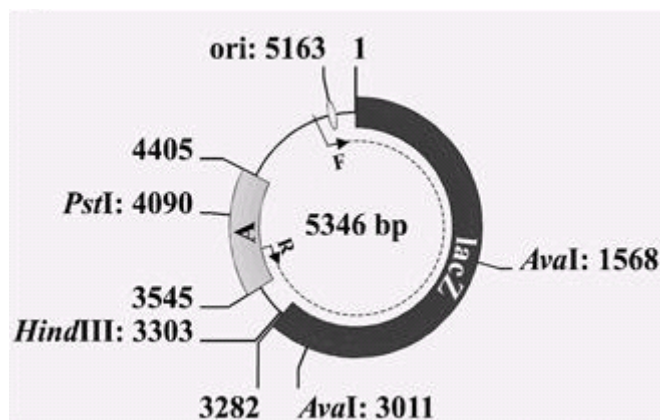
To ulike mastermikser ble laget for kjøring av PCR (se Tabell 2). Det ene inneholdt primeren Ava og det andre Hind III. Ava har to kuttsetter, et ved basepar 1568 og det andre ved basepar 3011 (Se figur 11). Dette vil gi tre bånd på henholdsvis 1992, 1143 og 818 bp dersom prøven ikke inneholder størrelsesendringer. Et hvert annet båndmønster er en størrelsesendring. Som nevnt tidligere i innledningen under kilder for artefakter, har Hind III en stor aktivitet. Det kan gjøre at prøver som ikke inneholder størrelsesendringer, likevel framstår som en størrelsesendring ved at man får bånd som avviker fra de på 1992, 1143 og 818 bp. Ved å kjøre en Hind III kutting på alle prøver registrert som størrelsesendring, kan

man få bekreftet hvilke som er reelle. Hind III kutter ved basepar 3303, og dermed vil man få to bånd om størrelsesendringen er reell. Tre eller flere bånd betyr at plasmidet har blitt kuttet under isoleringsprosessen og blir da registrert som en ikke-størrelsesendring.

10 µl Ava og Hind III mastermiks ble lagd pr prøve (se tabell 2) og 5 µl prøve fra PCR amplifikasjonen ble tilsatt. Mastermiksen er etter oppskrift fra Garcia, Busuttil et al. (2007).

Tabell 3: Beskrivelse av reagenser i mastermiksen til restriksjonskutting av 100 prøver.

Reagenser:	pr.prøve	100 prøver
10xNEB#4 buffer	1,5µl	150µl
Ava I/Hind III enzym, 10µg/µl	0,5µl	50µl
dH2O	8µl	800µl
Total volum	10µl	1000µl



Figur 11. Kart over pUR288 plasmid med LacZ gen (1-3282) og Ava og Hind III setene. Figur hentet fra: http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007_978-1-59745-361-5_20-1

Ava og Hind III restriksjonsseter

Ava I restriksjonssete (som oppgitt av produsent)



Hind III restriksjonssete (som oppgitt av produsent)

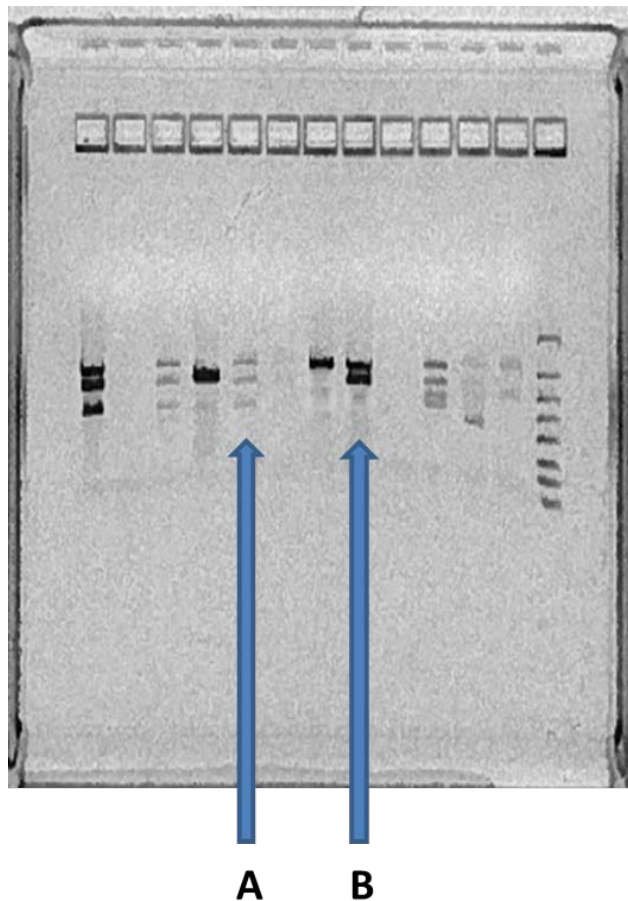
5'...A[▼]AGCTT...3'
3'...TTCGA[▲]A...5'

PCR-program

Ava I restriksjonskuttingen ble kjørt på Biorad PCR-maskin på 37 °C, i 12x 60 min, og deretter på 80 °C i 20 min for inaktivering. Hind III restriksjonskuttingen ble kjørt på Eppendorf Thermocycler PCR-maskin ved 37 °C i 5x60 min og ved 65 °C i 20 min for inaktivering. (Garcia, Busuttil et al. 2007)

2.6.4 Gel elektroforese analyse

Prøvene fra Ava og Hind III kuttingen ble tilsatt 2 µl FlashGel loading dye og kjørt på 1,2 % Lonzageler, i 6 min på 250V. Se figur 12 for eksempel på forventet type båndmønstre, hvor A er et båndmønster uten størrelsesendring og B er et eksempel på båndmønster med størrelsesendring.



Figur 12. Eksempel på ulike båndmønstre som kan oppstå. A viser mønsteret ved ingen størrelsesendring, med tre bånd på ca 2,0kb, 1,4kb og 0,8kb, og B viser en størrelsesendring, som er alle typer båndmønstre ulike fra A.

2.7 DNA sekvensering

For kloner som ikke har størrelsesendring må vi anta de mutante klonen har punktmutasjoner.

Vi kjører en sekvensering for å karakterisere noen av disse punktmutasjoner.

2.7.1 Oppdyrking av LacZ kloner og DNA isolering

Først må glycerolstokkene dyrkes opp på nytt, deretter må DNAet isoleres og renses, før sekvenseringsreaksjonen kan finne sted.

Fordel 8 ml autoklavert LB medium i 12 autoklaverte erlenmeyer kolber. Tilsett deretter 8 µl kanamycin (25µg/ml) og 12 µl ampicillin (150µg/ml) til hver kolbe.

Overfør prøvene fra glyserolstock og over i erlenmeyer kolbene. Dyrk prøvene over natt ved 37 °C ved 225 rpm, dvs ca 16-17 timer (Garcia, Busuttil et al. 2007).

DNA isolering og rensing

Overfør prøvene fra erlenmeyer kolbene og over i falcon rør. Spinn prøvene ved 272g i romtemperatur. Fjern supernatant, uten å røre bunnfallet, men la ca 1ml være igjen for resuspending. Overfør bakteriekulturen til mikrosentrifugerør og sentrifuger ved 8000 rpm i 3 min ved romtemperatur.

QIAprep Spin Miniprep Kit brukes for å isolere plasmid DNAet i henhold til protokoll fra produsent:

- Pelleten resuspenderes i 500 µl Buffer P1, tilsatt RNase A, og fordeles deretter over i 2 rør.
- 250 µl Buffer P2 tilsettes hvert rør og blandes ved å vende røret opp ned 10-12 ganger til løsningen blir blå (ved tilsatt lyseblue). La lyseringsreaksjonen pågå 5 min, men ikke lenger.
- Deretter tilsettes 350 µl buffer N3 for å stoppe lyseringsprosessen, Tuben vendes 4-6 ganger. Nå skal løsningen bli klar (ved tilsatt lyseblue).
- Sentrifugeres i 10 min ved 17900g.
- Supernatanten overføres til QIAprep spinkolonner. Sentrifuger i 30-60 sekunder ved 14000 rpm og flow-throughen kastes.
- Spinkolonnene tilsettes så 0,5 ml Buffer PB, sentrifugeres i 30-60 sekunder ved 17900 g og flow-throughen kastes igjen.

- Deretter tilsettes 0,75 ml Buffer PE. Igjen sentrifugeres prøvene ved 17900 g i 30-60 sekunder og flow-througen kastes.
- Sentrifuger i 1 min ved 17900 g for fjerne overflødig vaskebuffer.
- Plasser QIAprep spin kolonnene i et rent 1,5 ml sentrifugerør og tilsett 50 µl Buffer EB for å felle ut DNAet. La stå i 1 min og sentrifuger i 1 min ved 17900 g.
- Prøvene vannes ut med 50 µl ultrapure vann.

DNA konsentrering:

Prøvene oppkonsentreres ved å bruke Amicon Ultra 30K (Millipore) i henhold til protokoll fra produsent:

- Plasser amicon ultra enheten inn i et medfølgende sentrifugeringsrør.
- To og to av de like prøvene overføres til samme til Amicon ultra filter enhet, totalt ca 200 µl, og lukkes.
- Plasser filterenheten i sentrifugen med bakdelen på lokket inn mot midten.
- Spin på 14000 x g i 10-30 minutter
- Ta filterenheten ut av sentrifugen, ta enheten ut av sentrifugerøret og plasser det opp ned i et rent mikrofugerør.
- Plasser røret i sentrifugen med lokket mot midten. Spinn i 2 minutter ved 1000 x g for å overføre den konsentrerte prøven til tuben.
- Det konsentrerte plasmid DNAet resuspenderes i 45 µl ultrarent vann

(Garcia, Busuttil et al. 2007).

2.7.2 Måle DNAets mengde og renhet ved nanodrop

Mengden DNA beregnes for hver prøve. Det er ønskelig å kunne sekvensere prøver som inneholder 300-500 ng DNA, ettersom testing i startfasen da ga best resultat ved sekvensering.

Software programmet NanoDrop ND-1000 version 3.7.1, under kategori nukleinsyrer ble brukt i analyseringen. Det ble tilsatt 2 µl DNA prøve, og maskinen ble renset med 2 µl nuklease fritt vann mellom hver prøve.

Nanodropen brukes også til å få en indikasjon på hvor ren prøven er. En 260nm/280nm andel på ca 1,8 og en 260nm/230nm andel på rundt 2,0-2,2 anses for å være rent DNA. DNA prøver med avvik fra disse målene indikerte tilstedeværelsen av proteiner eller fenoler og ble ikke brukt, i henhold til protokoll

2.7.3 Sekvensering

Prøvene forberedes for sekvensering ved å bruke et DTCS quik start kit og følge protokollen til leverandøren. Kitet inneholder en DTCS quik start mastermiks miks inneholdende DNA polymerase, dNTPer, terminatorene ddUTP, ddGTP, ddCTP og ddATP og reaksjonsbuffer.

Dette blandes sammen med resten av reagensene som vist i tabell 3. For å få sekvensert opp hele LacZ genet må man bruke 8 ulike primere (se tabell 5), og det blir derfor lagd en PCR mastermiks for hver. I tillegg forberedes en kontroll prøve (se tabell 4) som test for å se om sekvenseringen var vellykket.

PCR program

Først kjøres det 2 min på 95 °C. Deretter er det 30 sykluser, hver bestående av 27 sekunder på 95 °C, 27 sekunder på 50 °C og 4 minutter på 60 °C. Etter 30 fullførte sykluser står prøvene på 4 °C.

Tabell 3. Beskrivelse av reagenser til PCR mastermiks for 12 prøver

Reagenser	1 Prøve	12 prøver
DNA plasmid (300-400 ng)	1-5 µl	12-60 µl
H2O	5-9 µl	60-108 µl
1,6 mM primer	2 µl	24 µl
DTCS Quick Start	8 µl	96 µl
Total	20 µl	240 µl

Tabell 4. Beskrivelse av reagenser til PUC18 kontroll blanding

Reagenser	1 prøve
H2O	9 µl
pUC18	1 µl
Primer	3 µl
Quick start kit	8 µl

Tabell 5: Beskrivelse av primersekvensene brukt i PCR.

Primer	Sekvens
pUR0366-F	5`CAG TTG CGC AGC CTG AAT GG 3`
pUR0794-F	5`TGA CGG CAG TTA TCT GGA AG 3`
pUR1234-F	5`ATG GTC TGC TGC TGC TGA AC 3`
pUR1671-F	5`CAG TAT GAA GGC GGC GGA GC 3`
pUR2113-F	5`CCG GGC AAA CCA TCG AAG TG 3`
pUR2552-F	5`GCC GCT GCG CGA TCA GTT CA 3`
pUR5268-F	5`CCG CCT TTG AGT GAG CTG AT 3`
pUR3367-R	5`GCG TAT CAC GAG GCC CTT TC 3`

Rens av prøvene til DNA sekvensering

NucleoSEQ kolonner brukes for å rense PCR prøvene fra salter, spor av organiske løsninger og primere. Kolonnene må først rehydreres. Da spinner man ned kolonnene ved 3400 rpm i 30 sekunder. Deretter tilsettes 600 µl vann til hver kolonne, som vortexes til alt innhold er oppløst. Kolonnene står så i kjøleskap ved 4 °C til neste dag. Neste dag vortexes kolonnene lett for å resuspendere resinet. Bunnen fjernes fra spinnkolonnen og plasseres tilbake i røret. Deretter sentrifugeres kolonnene ved 2700 rpm i 2 min med «hingen» ut. Overfør spinnkolonnene til et rent 1,5 ml eppendorf rør. Tilsett sekvenseringsreaksjonen midt på gelen uten å komme borti gelen. Sentrifuger i 5 minutter ved 2700 rpm. Pass på at spinnkolonnen fremdeles er med «hingen» ut og at eppendorf rør lokkene er vendt innover i sentrifugen. Fjern spinnkolonnene. Tørk i vakuumkonsentratoren i 30-40 minutter. Løs prøvene opp i 40 µl SLSbuffer som følger med Quick start kitet. La stå i 2-5 minutter. Bland lett og spinn ned. Overfør alt til prøveplaten. Legg en dråpe mineralolje over prøvene.

Sekvenseringsreaksjon

Separasjons buffer, separasjonsgel LPA1, og kapillær i tillegg til prøveplaten monteres i en CEQ 8000 sekvenseringsmaskin. Prøvene ble kjørt på standardprogrammet LFR-1 (kapillær 50 °C, denaturering 90 °C i 120 sekunder, injisering ved 2,0 kv i 15 sekunder og separasjon ved 4,2 kv i 85 min).

2.7.4 Analysering av sekvenseringsresultatene

For å finne ut hvilke mutasjoner LacZ genet har, sammenlignes sekvensen med SYNPUR288V sekvensen funnet på NCBI hjemmesider ved å gjennomføre et nukleotidsøk. Sammenstillingen skjer ved å gå inn på EMBL-EBIs hjemmeside og ta i bruk Emboss matcher, et program som brukes for å sammenstille to sekvenser basert på lokale likheter og som er basert på Bill Pearsons lalign applikasjon, versjon 2.0u4.

LacZ plasmid musen kan deles inn i to ulike muselinjer, 60 og 30, hvor sistnevnte er brukt i dette forsøket. Denne muselinjen har 3 polymorfiske seter som man kjenner til, og blir dermed luket ut under analysen av sekvenseringsresultatene (Garcia, Busuttil et al. 2007).

2.8 Statistikk

Både mutantfrekvens, andelen størrelsesendringer og aktuelle punktmutasjoner ble analysert ved bruk av toveis varians analyse (ANOVA) for å teste statistiske ulikheter med genotype (Min eller wt) og behandling (HMF eller kontroll) som faktorer. Siden resultatene ikke var normalfordelte ble de ranket. Ved observert signifikans ble Holm-Sidak metoden brukt. One way sample t-test ble også brukt ved observert interaksjon.

3. Resultater

3.1 Resultater fra sondeforingsforsøk

Mutantfrekvens

Ingen statistisk signifikante forskjeller i mutantfrekvens ble observert for lever (Figur 13A), hverken for genotype eller behandling.

Det var en sterk tendens til at Min mus hadde høyere mutantfrekvens i tykktarm enn wt mus, uavhengig av behandling med HMF ($p=0,057$). I tykktarmen hadde HMF-behandlede Min mus 1,5 ganger høyere mutantfrekvens sammenlignet med ubehandlede Min mus, men dette var ikke signifikant ($p=0,555$) (Figur 13B).

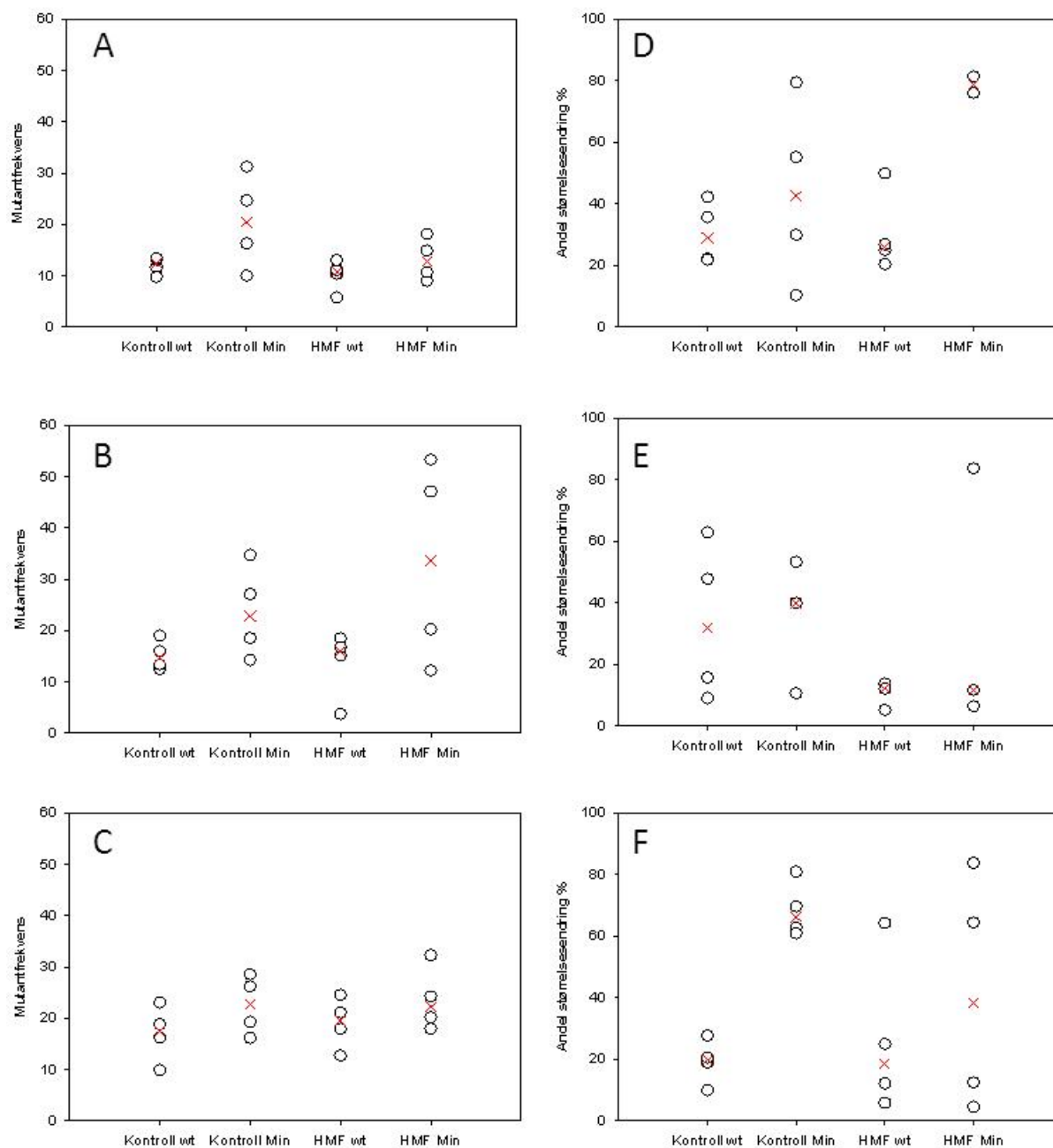
Det ble ikke målt noen signifikante forskjeller i mutantfrekvens for tynntarm (Figur 13 C).

Størrelsesendring

Det var en sterk tendens til at Min mus hadde høyere andel størrelsesendringer i LacZ genet i kloner fra lever sammenlignet med kloner fra wt mus, uavhengig av behandling ($p=0,055$) (Figur 13D).

I tykktarmen var det ingenting statistisk signifikante forskjeller i størrelsesendringer i LacZ genet, hverken for genotype eller behandling (Figur 13E).

I tynntarm er det en tendens til høyere andel størrelsesendringer i LacZ genet hos Min mus sammenlignet med wt mus ($p=0,081$) (Figur 13F), men det var ingen statistisk signifikante forskjeller i størrelsesendringer i LacZ genet som følge av behandling med HMF.



Figur 13. Et spredningsdiagram med lodrette punkter viser andelen størrelsesendringer og mutantfrekvens hos Min mus og wt mus behandlet med HMF 750 mg/kg kroppsvekt eller 0,9 % NaCl (kontroll) ved sondeforing 3 ganger per uke i 4 uker. Hver mus er markert ved en sirkel og median er kryssmerket. A-C viser andelen mutantfrekvensen i henholdsvis lever, tykktarm og tynntarm. D-F viser størrelsesendring i henholdsvis lever, tykktarm og tynntarm.

3.2 Resultater injiseringsforsøk

Mutantfrekvens

Det var en tendens til at Min mus hadde høyere mutantfrekvens i lever sammenlignet med wt mus, uavhengig av behandling ($p=0,091$) (Figur 14A).

HMF-behandlede Min mus hadde 1,5 ganger lavere mutantfrekvens i tykktarm sammenlignet med ubehandlede Min mus ($p=0,047$). Den samme observeres for wt mus, hvor HMF behandling også ga en 1,5 ganger reduksjon i mutantfrekvens sammenlignet med ubehandlede wt mus, men dette var ikke statistisk signifikant ($p=0,150$) (Figur 14B).

I tynntarmen var det en signifikant interaksjon mellom genotype og behandling ($p=0,026$). Hos wt mus ble det observert høyere mutantfrekvens i behandlingsgruppa enn kontrollgruppa, men hos Min mus ble det observert høyere mutantfrekvens i kontrollgruppa enn behandlingsgruppa. I tillegg ble det observert statistisk signifikant forskjell mellom ubehandlede Min og wt mus, hvor Min mus hadde dobbelt så høy mutantfrekvens. Det ble også observert statistisk signifikant forskjell mellom HMF-behandlede og ubehandlede Min mus, hvor ubehandlede Min mus hadde 1,6 ganger høyere mutantfrekvens. På grunn av den observerte interaksjonen mellom genotype og behandling, ble det kjørt en ny statistikk på de sistnevnte gruppene. Forskjellen på mutantfrekvens mellom kontroll Min og kontroll wt mus var fremdeles signifikant ($p=0,001$). Det var også forskjellen på mutantfrekvens hos HMF-behandlede Min og kontroll Min mus ($p=0,003$).

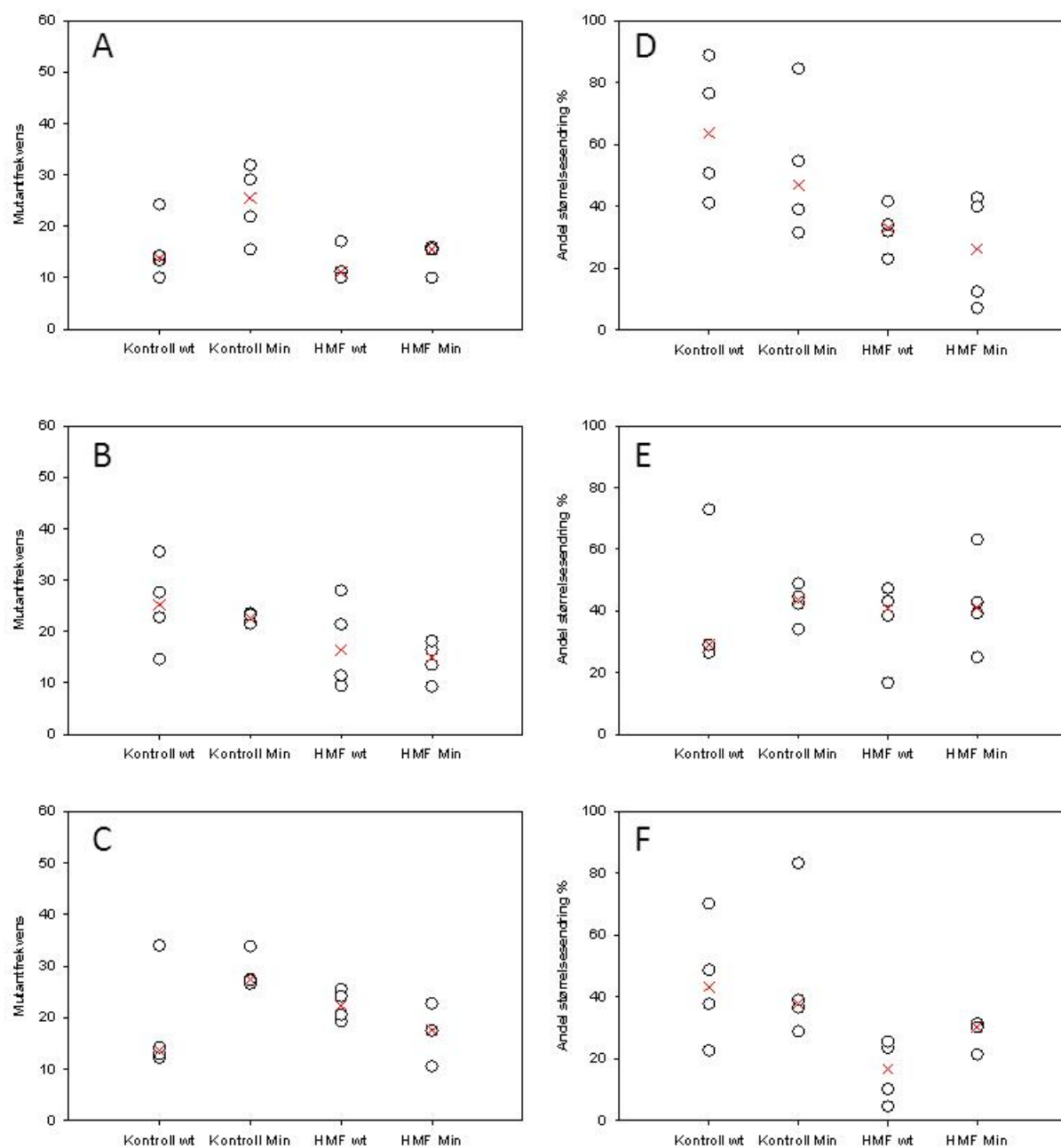
Størrelsesendring

Ubehandlede Min og wt mus hadde en statistisk signifikant større andel størrelsesendringer i LacZ genet fra lever enn HMF-behandlede Min og wt mus ($p=0,020$). Det var 1,8 ganger flere

størrelsesendringer i LacZ genet hos ubehandlet Min mus i motsetning til HMF behandlet Min mus, og for wt mus var denne forskjellen 1,9 ganger (Figur 14D).

I tykktarm er det ingen signifikant forskjell i størrelsesendringer i LacZ genet hverken i forhold til behandling eller genotype (Figur 14E).

I tynntarmen til ubehandlede Min og wt mus var det henholdsvis 1,3 og 2,6 ganger større andel størrelsesendringer i LacZ genet sammenlignet med HMF-behandlede Min og wt mus ($p=0,009$) (Figur 14F).



Figur 14 Et spredningsdiagram med lodrette punkter viser forskjellen på andel mutantfrekvens og størrelsesendringer hos Min mus og wt mus gitt én enkel subkutan injeksjon 3-6 dager etter fødsel med enten HMF 500 mg/kg kroppsvekt eller 0,9 % NaCl (kontroll). Hver mus er markert med en sirkel og median er kryss merket. A-C viser mutasjonsfrekvensen i henholdsvis lever, tykktarm og tynntarm. D-F viser andel størrelsesendring i henholdsvis lever, tykktarm og tynntarm.

DNA Sekvensering

Leverprøver fra injiseringsforsøket ble valg ut til sekvensering fordi vi fant signifikante forskjeller i størrelsesendringer i LacZ genet mellom ubehandlede og HMF behandlede mus. Punktmutasjoner ble karakterisert i de klonene som ikke hadde størrelsesendringer, for begge genotyper med og uten behandling.

I tabell 6 er det en oversikt over observerte mutasjoner som er statistisk signifikante, eller viser tendenser til signifikans, enten med hensyn på genotype (Min/wt) eller behandling (HMF/NaCl), eller interaksjon mellom genotype og behandling. Plasseringen samt prosentandelen av de statistisk signifikante mutasjonene observert i LacZ genet er også vist i tabell 6. En fullstendig oversikt over alle mutasjoner observert i lever hos Min og wt mus i begge behandlingsgrupper med tilhørende plassering i LacZ genet er listet opp i vedlegg 1, fra side 70. Resultatene i tabell 6 viser at statistisk signifikante punktmutasjoner som oppstår som følge av behandling hovedsakelig er plassert cirka rundt kode 1200 i LacZ genet, mens signifikant forskjellige mutasjoner som følge av genotype hovedsakelig er plassert lenger ut i LacZ genet, fra cirka kode 1300 til kode 2600.

Det er også interessant å se etter punktmutasjoner som kan være forårsaket av oksidative skader og derfor er andel endringene av guanin til adenin, tymin eller cytosin er listet opp i tabell 7. Den oksidative mutasjonen som hadde høyest andel av punktmutasjonene var G:C → T:A, men andelen oksidative DNA mutasjoner var ikke endret som følge av behandling med HMF eller som følge av genotype. HMF behandling hadde derfor ingen effekt på andelen av oksidative skader i LacZ genet (tabell 7).

Tabell 6. Oversikt over mutasjoner med tilhørende plassering i LacZ genet i lever hos Min og wt mus gitt én enkel subkutan injeksjon med HMF (500 mg/kg kv) eller NaCl (0,9 %) og prosentandelen mutasjoner observert. Kun mutasjoner som viste statistisk signifikante forskjeller, eller tendenser til signifikans er tatt med i tabellen.

Posisjon	Endring	Behandlingsgrupper				p-verdi		
		Kontroll wt	Kontroll Min	HMF wt	HMF Min	Genotype	Behandling	Gen. x Beh.
560	T→C	21 %	0 %	0 %	19 %			0,08
1195	A→C	94 %	100 %	69 %	69 %		0,009	
1197	G→T	6 %	0 %	31 %	22 %		0,041	
1198	C→A	94 %	100 %	69 %	69 %		0,009	
1199	C→T	94 %	100 %	69 %	78 %		0,041	
1200	T→G	94 %	100 %	69 %	78 %		0,075	
1294	A→T	35 %	59 %	17 %	83 %	0,016		
1485	A→T	17 %	0 %	61 %	21 %	0,012		
2582	G→T	63 %	15 %	42 %	13 %	0,031		
2585	G→C	58 %	32 %	31 %	8 %	0,087		
2615	C→T	13 %	28 %	8 %	36 %	0,097		

Tabell 7 Viser andelen G:C→A:T, G:C→T:A og G:C→C:G endringer observert i leveren til Min og wt mus gitt én enkel subkutan injeksjon med HMF (500 mg/kg kv) eller NaCl (0,9 %).

Endring	Gruppe	Andel
G:C→A:T	Kontroll wt	6 %
	Kontroll Min	6 %
	HMF wt	7 %
	HMF Min	7 %
G:C→T:A	Kontroll wt	16 %
	Kontroll Min	12 %
	HMF wt	17 %
	HMF Min	15 %
G:C→C:G	Kontroll wt	5 %
	Kontroll Min	7 %
	HMF wt	2 %
	HMF Min	5 %

4. Diskusjon

To ulike forsøk har blitt utført hvor HMF har blitt gitt til LacZ/Min mus enten ved injeksjon eller ved sondeforing. Mutantfrekvens og størrelsesendringer i LacZ genet ble analysert i vev fra begge forsøkene. Sekvensering av LacZ genet ble kun utført på lever kloner fra injeksjonsforsøket hvor størrelsesendringer ikke ble observert., og hvor det var sannsynlig å finne punktmutasjoner.

Er HMF genotoksisk i LacZ plasmid mus?

HMF har blitt påvist å være svakt genotoksisk i flere *in vitro* studier (Janzowski, Glaab et al. 2000; Severin, Dumont et al. 2010; Glatt, Schneider et al. 2012), selv om flere av disse studiene brukte høye konsentrasjoner av HMF. Genotoksisiteten til HMF økte i transfekterte celler med human SULT (Glatt, Schneider et al. 2005; Durling, Busk et al. 2009). Vi har ikke funnet publikasjoner hvor genotoksisiteten av HMF er studert *in vivo*.

Resultatene på både mutantfrekvens og størrelsesendringer viste store individuelle variasjoner mellom musene innenfor samme behandling og genotype i begge dyreforsøkene. Dette gjør at sensitiviteten i forsøkene våre er relativt lav, og effekt av behandling og/eller genotype må være høy for å gi statistisk signifikante endringer. Det ble brukt fire forsøksdyr i hver gruppe på begge forsøkene, og det er i den nedre enden av hva som er vanlig praksis i genotoksisitets forsøk med transgene musmodeller som LacZ plasmid musen (Noda, Suzuki et al. 2002; Maddox, Wang et al. 2008; Mahabir, van Benthem et al. 2008; Chen, Heflich et al. 2010). I tillegg blir det i OECD retningslinjer 488 for testing av kjemikalier, anbefalt å bruke minst fem dyr i hver forsøksgruppe. I ettertid kan vi se at det kunne vært en fordel å øke antall dyr i gruppene noe.

Mutantfrekvens

Sondeforingsforsøket viser en ubetydelig forskjell mellom HMF-behandlet og ubehandlet wt og Min mus for alle tre organer. I både lever, tykktarm og tynntarm er mutantfrekvensen høyere for kontroll gruppa enn for behandlingsgruppa innenfor begge musmodellene i injiseringsforsøket. Tallene er derimot kun signifikante for tykktarm hvor mutantfrekvensen for HMF-behandlede Min mus var 1,5 ganger lavere enn for ubehandlede Min mus ($p=0,047$) og for tynntarm hvor samme musmodell viste 1,6 ganger høyere mutantfrekvens for

ubehandlet enn for behandlet mus ($p=0,018$). Disse resultatene kan tyde på at HMF reduserer genotoksisiteten i LacZ mus. I følge OECDs retningslinje 488 for utprøving av kjemikalier skal det være en klar økning i mutantfrekvensen ved en enkel dose gruppe sammenlignet med kontrollgruppen. Mutantfrekvens på under 2 ganger i forskjell mellom behandlingsgruppene blir her ikke sett på som relevant, trass i statistisk signifikans.

Et forsøk som involverte endotele celler fra navlestreng vene (HUVEC) behandlet med HMF isolert fra svart hvitløk, viste at HMF hindrer aktiveringen av NF- κ B og undertrykket dannelsen av ROS (Kim, Choi et al. 2011). NF- κ B transkripsjonsfaktor er involvert i celleproliferering, og hindrer cellen å gå inn i apoptose. Konstitutivt aktiv NF- κ B er dermed ofte observert hos kreftceller (Mayo and Baldwin 2000). HMF kan muligens indusere apoptose ved å inhibere aktivering av NF- κ B. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor vi observerer lavere mutantfrekvens for HMF behandlede enn ubehandlede mus.

Et forsøk med FVB/N mus viste at den reaktive forbindelsen SMF dannes *in vivo* ved eksponering for HMF (Monien, Frank et al. 2009). Manglende effekt av HMF på mutantfrekvens i lever kan tyde på at dannelsen av den reaktive metabolitten SMF i lever ikke er tilstrekkelig høy til å øke mutantfrekvensen i LacZ. Dannelse av SMF er avhengig av SULT, og SULT uttrykkes hovedsakelig i lever hos mus. Derfor er lever det organet hvor vi ville forvente høyest effekt av HMF. Et annet forsøk hvor det også ble brukt FVB/N mus behandlet med HMF, viste at mus som uttrykte human SULT hadde betydelig høyere andel sulfokonjugering enn wt mus (Florian, Bauer-Marinovic et al. 2012).

Et *in vitro* forsøk utført av Glatt, Schneider et al. (2005), hvor human SULT ble transfektert inn i V79 celler (V79-hCYP2E1-hSULT1A1), viste at HMF økte søster-kromatid bytte (SCE) og at SCE økte når human SULT var tilstede. Celledinjen V79-Mz, som ikke uttrykker human SULT1A1 hadde en svak SCE induksjon etter HMF behandling, og det ble diskutert om

umetabolisert HMF kan ha produsert effekten grunnet sin α,β -umettede aldehyd gruppe. Et annet *in vitro* forsøk utført av Monien, Engst et al. (2012) hvor det også ble tatt i bruk V79 celler som uttrykker human SULT1A1, ble det påvist genmutasjoner etter HMF behandling. V79 celler som ikke uttrykte human SULT derimot viste ingen signifikant mutagen effekt.

Man kan ikke utelukke at HMF er genotoksisk i menneske. Humane SULTer er uttrykt i både lever, tykktarm og tynntarm, hvor spesielt SULT1A1 uttrykkes i høye nivå (Teubner, Meinl et al. 2007). SULTer fra mus uttrykkes i de samme organene, men høyest nivå av SULTer er observert i lever og muse *sult1a1* uttrykkes ikke i tynntarmen (Alnouti and Klaassen 2006). Dermed kan det være at manglende observert genotoksisitet skyldes at muse SULTene ikke er like effektive som de humane. Det har som nevnt blitt utført forsøk som har vist at sulfokonjugering er høyere hos SULT mus enn hos wt mus og at HMF fører til genmutasjoner når humane SULTer er tilstede. Det kan være at HMF er et dårligere substrat for muse SULT enn for human SULT, eller at musen generelt er mindre følsom for HMF. I følge (Glatt H. 2006) har human SULT1A1 som er vidt utbredt i kroppen (Hempel, Gamage et al. 2007), høy enzymatisk aktivitet mot HMF, mens det ortologe muse *Sult1a1* enzymer er mindre aktivt mot HMF. Ut i fra målingene av mutantfrekvens i LacZ mus, så kan vi ikke si at HMF er genotoksisk i mus.

Størrelsesendringer

Selv om HMF ikke har stor effekt på mutantfrekvens i LacZ mus, så kan HMF likevel påvirke celler i et vev ved å endre mutasjonstypene i vevet. Derfor valgte vi å undersøke om HMF påvirket andel kloner med størrelsesendringer i LacZ genet.

Når det gjelder størrelsesendningsforsøket ble det vist at ubehandlede Min og wt mus hadde en statistisk signifikant større andel størrelsesendringer, på henholdsvis 1,8 og 1,9 ganger, enn tilsvarende HMF behandlede mus ($p=0,020$) i lever etter injisering av HMF. Det samme ble observert for tynntarmen ($p=0,009$), hvor det var 1,3 og 2,6 ganger flere størrelsesendringer hos henholdsvis ubehandlede Min og wt mus. I sondeforingsforsøket ble det ikke observert noen signifikante forskjeller mellom de to behandlingsgruppene, hverken for Min eller wt mus.

LacZ plasmid- og MutaTM musemodellene ble testet for å sammenligne evnen deres til å detektere størrelsesendringer (Mahabir, van Benthem et al. 2008). LacZ plasmid musemodellens evne til å detektere størrelsesendringer var noe svakere enn forventet, men musemodellen var likevel lovende med optimalisering. Muta musen er som tidligere nevnt, ikke egnet til å detektere størrelsesendringer (Lambert, Singer et al. 2005). Dermed kan man ikke helt utelukke at det kan være størrelsesendringer tilstede som ikke blir fanget opp.

Ulike α,β -umettede karbonylforbindelser ble brukt for å undersøke hva slags typer oksidative skader de produserte. Både oksidative purin modifiseringer og DNA brudd ble observert (Janzowski, Glaab et al. 2003).

I tillegg er HMF vist å minke intracellulær glutathione hos V79-celler, Caco-2 celler og primære rotte hepatocytter (Janzowski, Glaab et al. 2000). Dette gjør cellen mer utsatt for oksidative radikaler, og er også vist å føre til DNA fragmentering etterfulgt av apoptose eller nekrose (Higuchi 2004).

Det er blitt observert en signifikant forskjell i andel størrelsesendringer hos mus behandlet med HMF ved injisering. Hos ubehandlede wt mus er det observert mer enn 2 ganger så høy andel størrelsesendringer i lever og tynntarm i forhold til HMF-behandlet wt mus. Hos Min musen ble det observert samme resultater, men ikke like sterke. Derimot ble det ikke

observert noen signifikante forskjeller ved sondeforing. Det er blitt trukket fram ulike årsaker til hvorfor den største andelen av mutasjoner observert hos HMF-behandlede mus er punktmutasjoner, og de fleste går ut på at HMF kan føre til så store skader at apoptose blir initiert. Dermed vil overvekten av de HMF behandlede musene ha celler hvor DNAet inneholder flest punktmutasjoner. Ellers er alternativet at musemodellen ikke klarer å oppdage alle punktmutasjoner. Et siste alternativ kan være at HMF også har en beskyttende mekanisme som tidligere nevnt (Kim, Choi et al. 2011). Ut i fra forsøkene i denne oppgaven må man konkludere med at HMF behandling fører til signifikant forskjell på andelen størrelsesendringer i DNAet til HMF behandlede mus sammenlignet med kontroll mus.

Sekvensering

Komet assay (enkelcellet gelelektroforese (SCG)) er en teknikk som brukes for å visualisere DNA skader i individuelle celler. Prosedyren kan brukes på både kultiverte celler og vevsceller (Fairbairn, Olive et al. 1995). Komet assayet kan modifiseres for å oppdage mer spesifikke skader ved å ta i bruk en DNA glykosylase (Collins 2004), slik at oksidative skader på DNA kan detekteres. Innledende forsøk utført av Anja Hortemo Sæther ved Avdelingen for mat, vann og kosmetikk ved Nasjonalt folkehelseinstitutt fant indikasjoner på økt DNA modifisering etter oral HMF behandling av transgene mus som uttrykker humane SULTer. DNA skadene ble synlige etter behandling med det bakterielle enzymet FPG (formamidopyrimidine DNA N-glykosylase/AP lyase), hvor oksiderte puriner, inkludert 8-okso guanin, er hovedsubstratet (Collins 2004). Dermed kan man hypotetisere om HMF bidrar til dannelsen av oksiderte baser hos mus eksponert for stoffet oralt. I et komet forsøk på cellelinjer som uttrykker humane sulfotransferaser ble det påvist statistisk signifikant økning av DNA skader etter behandling med HMF (Durling, Busk et al. 2009). Janzowski, Glaab et

al. (2000) utførte også en komet assay hvor V79 celler og Caco-2 celler ble behandlet med HMF. Ingen økning i DNA skade ble observert. Severin, Dumont et al. (2010) derimot observerte genotoksiske effekter hos HepG2 celler behandlet med HMF ved komet assay. Ingen av disse forsøkene tok i bruk FPG for å påvise oksidative skader.

Sekvensering av LacZ genet fra lever kloner ble utført for å se etter generelle punktmutasjoner og mutasjoner hvor guanin hadde blitt endret til enten adenin, cytosin eller spesielt tymin. Dette er den vanligste mutasjonen å se etter for å bekrefte oksidative skader.

Sekvenseringsresultatene antyder at området rundt 1200 basepar er mer sensitiv for behandling, mens mutasjoner i området rundt 2500 basepar i større grad avhenger av genotype. Resultatene er ikke konsekvente i forhold til behandling eller genotype, og er derfor vanskelig å tolke. I nærliggende områder vil HMF både gi signifikant økt og redusert antall punktmutasjoner. Det er ikke mulig å konkludere på basis av disse resultatene.

Sekvenseringsresultatene viste høyere prosentandel G:C→T:A transversjoner for både behandlet Min og wt mus i forhold til ubehandlet Min og wt mus. HMF behandlet Min mus viste 15 % G:C→T:A mot 12 % i kontrollgruppa og HMF behandlet wt mus viste 17 % andel samme transversjon mot 16 % i kontrollgruppa. Forskjellene både mellom HMF behandlet og ubehandlet gruppe og mellom musemodellene er så små at de ikke anses som viktige. Som nevnt under mutantfrekvens seksjonen har det også blitt vist at HMF inhiberer TNF α induisert ROS dannelse (Kim, Choi et al. 2011), hvilket også kan påvirke andelen oksidative skader observert. Sekvenseringsresultatene er basert på et lavt antall dyr i hver gruppe, men også et lavt antall prøver fra hvert dyr, og sensitiviteten i dataene er derfor noe begrenset. I tillegg kan det ikke utelukkes at det negative resultatet skyldes bruk av musemodeller som ikke uttrykker humane SULTer.

Betydning av funksjonelle grupper

Som nevnt i innledningen vet man at alkohol dehydrogenase kan biotransformere HMFs aldehyd gruppe til alkohol. Det er interessant om aldehyd gruppa også er utsatt for andre reaksjoner. Som også nevnt tidligere er aldehyd en elektrofil som er vist å kunne danne DNA addukter og transformere DNAet. Ikke bare har HMF et aldehyd gruppe, men karbon 2 og 3 (α og β) har dobbeltbindinger og det gjør gruppa ekstra reaktiv. Flere artikler har blitt publisert hvor ulike stoffer med en aldehydgruppe har blitt påvist å føre til DNA addukt dannelse med adenin og guanin (Chaudhary, Reddy et al. 1996; Wang, Dhingra et al. 1996; Chen, Wang et al. 2007; Olsen, Ovrebo et al. 2008)

Et forsøk hvor man studerte DNA addukt dannelse hos V79 celler eksponert for HMF og SMF ble utført av Monien, Engst et al. (2012). Enten kunne DNA addukter dannes ved reaksjon mellom nitrogenet til DNA basene ved nukleofil substitusjon av det elektrofile karbonatomet til SMF eller ved imin dannelse med aldehydet til HMF og SMF. Resultatene viste at reaksjon mellom nitrogenet til dAdo og dGua med SMFs elektrofile karbonatom var den dominerende reaksjonen. Kun svake resultater for imin dannelse med HMF ble observert. Derimot økte graden av N²-FFM-dGuo og N⁶-FFM-dAdo i DNAet til V79-hSULT1A1 celler med økt HMF konsentrasjon. Konklusjonen var at HMF må bioaktiveres av humane SULTer til SMF som så kan bindes til DNA.

HMF har en hydroksylgruppe som er utsatt for sulfonering av SULTer til SMF (Surh, Liem et al. 1994; Monien, Frank et al. 2009), et stoff som er påvist å være akutt toksisk (Bauer-Marinovic, Taugner et al. 2012). Forskjellen på dette forsøket og andre forsøk hvor toksisitet har blitt påvist (Bauer-Marinovic, Taugner et al. 2012; Monien, Engst et al. 2012), er at det her ikke har blitt tatt i bruk transgene mus som uttrykker humane sulfotransferaser.

Et annet forsøk utført av Durling, Busk et al. (2009) viste også at HMF induuerte DNA skader hos fem ulike cellelinjer som alle uttrykker humane SULTer. Interessant nok viste også resultatene høyest andel DNA skader hos cellelinjen med lavest SULT aktivitet, og lavest andel DNA skader hos cellelinjen med høyest andel SULT aktivitet. Dermed kan man ikke utelukke at det kan være andre mekanismer bak HMFs påviste genotoksisitet, noe som gjør stoffets aldehyd gruppe mer aktuell.

Betydning av eksponeringsvei for genotoksisitet av HMF

Genotoksisiteten av HMF kan påvirkes av hvordan dyr og mennesker eksponeres. Det er tidligere blitt nevnt at SULT er mest aktiv i lever hos mus. Dersom genotoksisitet skyldes SMF grunnet SULT metabolisme av HMF vil genotoksisiteten av HMF være uavhengig av eksponeringsvei fordi HMF må transporteres til lever for aktivering. Dersom aldehydet forårsaker genotoksisitet kan HMF føre til mutasjoner umiddelbart fra det øyeblikket stoffet entrer kroppen. Dermed vil tarm være mer utsatt ved sondeforing ettersom HMF passerer dette organet før lever.

Resultatene viser ingen høyere effekt i tarmen ved sondeforing enn injisering av HMF. Ei heller ble det observert høyere effekt i lever ved injisering og sondeforing av HMF. Resultatene viste lavere mutantfrekvens og mindre størrelsesendringer etter injisering med HMF, og ingenting statistisk signifikant etter HMF behandling i sondeforingsforsøket. Bruk av to ulike eksponeringsveier gir derfor ikke noen klar indikasjon på om metabolitten SMF eller aldehydet kan være genotoksisk.

Antagelig er ikke HMF sin aldehydgruppe tilstrekkelig reaktiv og derfor observeres ingen genotoksisk effekt i tarmen. Musmodellen brukt i dette forsøket har muligens, som tidligere

nevnt for lite aktivt SULT, i forhold til human SULT, til at noen effekt av HMF behandling blir observert i leveren.

Vil nedarvet skade i Apc gjøre cellene mer følsomme for DNA skader

I sondeforingsforsøket er det høyere mutantfrekvens for HMF behandlede Min mus enn HMF behandlede wt mus og høyere mutantfrekvens for kontroll Min mus enn kontroll wt mus i både lever, tykktarm og tynntarm. Ingen av disse resultatene var signifikante. Det var derimot en tendens til høyere mutantfrekvens i tykktarm hos Min mus enn wt mus ($p=0,057$) uavhengig av behandling. I leveren ble det også observert en tendens til at Min mus hadde høyere mutantfrekvens enn wt mus, uavhengig av behandling ($p=0,091$) i injiseringsforsøket, som i stor grad skyldes at kontroll gruppa til Min musen har høyere mutantfrekvens enn tilsvarende hos wt musen. Injiseringsforsøket viste en interaksjon mellom genotype og behandling i tynntarm. Det vil si at for Min musen ble det observert en lavere mutantfrekvens ved HMF behandling enn for kontrollgruppa, mens for wt mus førte samme behandling til høyere mutantfrekvens enn kontrollgruppa

Sondeforingsforsøket viste en tendens til høyere andel størrelsesendringer hos Min mus enn wt mus i både lever og tynntarm. Injiseringsforsøket viste ingen signifikante forskjeller på andelen størrelsesendringer mellom Min og wt mus i hverken lever, tykktarm eller tynntarm.

Najafzadeh, Baumgartner et al. (2012) testet genotoksisitet ved komet assay og mikronukleus assay i lymfocytter fra pasienter med ulike arvelige former for kreft, blant annet FAP pasienter med mutasjoner i Apc genet. Forsøket viste at pasienter med mutasjoner i Apc genet var mer følsomme for DNA skader etter UV stråling enn normale personer.

Tidligere har det også blitt vist at galle fra FAP pasienter gir mer DNA addukter enn galle fra normale personer (Scates, Spigelman et al. 1993)

Det har blitt utført forsøk som har vist at personer med et mutert Apc gen er mer følsomme for DNA skader enn de med et normalt Apc gen. Likevel viser ikke resultatene fra disse forsøkene noen signifikante forskjeller hverken mellom mutantfrekvens eller andelen størrelsesendringer til de to musemodellene. På bakgrunn av resultatene tilegnet her kan man ikke si at nedarvet skade i Apc gjøre cellene mer følsomme for DNA skader.

Apc mutasjoner og betydning for DNA reparasjon

APC er involvert i blokkeringen av DNA reparasjonsveien BER ved. Dette skjer ved at APC blokkerer BER ved å interagere med Pol- β og blokkere Pol- β rettet tråd forskyvning syntese i LP-BER, ved APCs interaksjon med Pol- β og påfølgende inhibisjon av dets deoksyribose fosfat (dRP) lyase aktivitet, som fører til blokkering av SP-BER og ved at APC interagerer med Fen-1 og inhiberer dets 5'-flap endonuklease og 5'-3'eksonuklease aktivitet, som fører til blokkering av LP-BER(Jaiswal, Balusu et al. 2006). Det har blitt foreslått at når DNA skadene når en viss terskel verdi fører det til at APC øker til et nivå hvor den resulterende inaktivering av BER fører til apoptose av den skadde cellen (Jaiswal and Narayan 2008). Dette vil føre til færre celler med DNA skade. Dette gjelder derimot kun for wt musa, ettersom Min musen har et APC protein på kun 850 basepar, og APCs DRI domene, som er Pol- β og Fen-1s interaksjonssted, derimot er lokalisert ved basepar 1245-1273. Dermed vil ikke Min musas forkortede APC protein kunne modulere BER (Jaiswal and Narayan 2008). Dersom det stemmer at celler med store DNA skader gjennomgår apoptose grunnet HMF, vil dette ikke bare påvirke mutantfrekvensen, men også andel størrelsesendringer observert, ettersom celler inneholdende DNA med store skader antagelig ville blitt definert som en

størrelsesendring. Det betyr at den reelle andelen størrelsesendringer kunne vært større enn det som er blitt observert.

5. Konklusjoner

I denne masteroppgaven er det undersøkt om HMF er genotoksisk og om et mutert Apc gen gjør DNAet mer følsomt for HMF.

1. Forsøk med LacZ mus eksponert oralt og ved injisering viste at HMF ikke var genotoksisk *in vivo*. Det kan likevel ikke utelukkes at HMF kan være genotoksisk for mennesker. Dette skyldes sulfotransferaser som antagelig er mer aktive hos menneske enn hos mus. Det anbefales å gjennomføre nye *in vivo* forsøk med mus som har fått transfektert inn humane SULT gener.

a. Det ble ikke observert økt mutantfrekvens grunnet HMF behandling hos LacZ plasmid mus.

b. Det ble observert en signifikant forskjell på andelen størrelsesendringer mellom HMF behandlede mus og kontroll mus. Dette ble kun observert i lever og tynntarm etter injisering av HMF, hvor det var flere punktmutasjoner i behandlingsgruppen enn kontrollgruppen. Betydningen av dette for genotoksisiteten til HMF er uklar.

c. HMF økte ikke antall oksidative DNA skader verken i Min eller wt mus. Det kan være metabolitten SMF som fører til oksidative skader, og ikke HMF. Det anbefales at en sekvensering blir gjennomført etter HMF behandling av mus med human SULT for å få dette bekreftet.

2. HMF ble vist ikke å være genotoksisk i LacZ mus. Tilstedeværelsen av mutert Apc i cellene økte ikke cellenes følsomhet for DNA skader etter HMF behandling.

2a og b. Det ble observert en tendens til høyere mutantfrekvens og større andel størrelsesendringer hos Min mus enn wt mus behandlet med HMF, men dette resultatet var ikke statistisk signifikant.

6. Referanser

- (1990). "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furfural (CAS No. 98-01-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 382: 1-201.
- (1993). "Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furan (CAS No. 110-00-9) in F344 Rats and B6C3F1 Mice(Gavage Studies)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 402: 1-286.
- Alnouti, Y. and C. D. Klaassen (2006). "Tissue distribution and ontogeny of sulfotransferase enzymes in mice." Toxicol Sci 93(2): 242-255.
- Archer, M. C., W. R. Bruce, et al. (1992). "ABERRANT CRYPT FOCI AND MICROADENOMA AS MARKERS FOR COLON CANCER." Environmental Health Perspectives 98: 195-197.
- Bauer-Marinovic, M., F. Taugner, et al. (2012). "Toxicity studies with 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulphooxymethylfurfural in wild-type mice and transgenic mice expressing human sulphotransferases 1A1 and 1A2." Arch Toxicol.
- Boerrigter, M., M. E. T. Dolle, et al. (1995). "PLASMID-BASED TRANSGENIC MOUSE MODEL FOR STUDYING IN-VIVO MUTATIONS." Nature 377(6550): 657-659.
- Bruce, W. R., M. C. Archer, et al. (1993). "DIET, ABERRANT CRYPT FOCI AND COLORECTAL-CANCER." Mutat Res 290(1): 111-118.
- Chaudhary, A. K., G. R. Reddy, et al. (1996). "Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry." Carcinogenesis 17(5): 1167-1170.
- Chen, L., M. Wang, et al. (2007). "Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of 7-ethylguanine in human liver DNA." Chem Res Toxicol 20(10): 1498-1502.
- Chen, T., R. H. Heflich, et al. (2010). "Differential mutagenicity of aflatoxin B1 in the liver of neonatal and adult mice." Environ Mol Mutagen 51(2): 156-163.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations." Molecular Biotechnology 26(3): 249-261.
- Dolle, M. E. T., W. K. Snyder, et al. (1999). "Background mutations and polymorphisms in lacZ-plasmid transgenic mice." Environmental and Molecular Mutagenesis 34(2-3): 112-120.
- Durling, L. J., L. Busk, et al. (2009). "Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases." Food Chem Toxicol 47(4): 880-884.
- EFSA (2004). "Report of the scientific panel on contaminants in the food chain on provisional findings on furan in food." The EFSA journal 137: 1-20.
- EFSA (2005). "Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commission related to flavouring group evaluation 13: furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substitutes and heteroatoms from chemical group 14." The EFSA journal 215 1-73.

- EFSA (2011). "EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) . Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 13, Revision 2 (FGE.13Rev2): Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14 " EFSA Journal 2011;9(8):2313. [126 pp.].
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive, et al. (1995). "THE COMET ASSAY - A COMPREHENSIVE REVIEW." Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology 339(1): 37-59.
- Fearon, E. R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 6. A. K. G. S. J. H. P. M. Abbas. 6: 479-507.
- Feron, V. J., H. P. Til, et al. (1991). "ALDEHYDES - OCCURRENCE, CARCINOGENIC POTENTIAL, MECHANISM OF ACTION AND RISK ASSESSMENT." Mutat Res 259(3-4): 363-385.
- Florian, S., M. Bauer-Marinovic, et al. (2012). "Study of 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulfoxymethylfurfural on induction of colonic aberrant crypt foci in wild-type mice and transgenic mice expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2." Mol Nutr Food Res 56(4): 593-600.
- Garcia, A. M., R. A. Busutil, et al. (2007). "Detection and analysis of somatic mutations at a lacZ reporter locus in higher organisms: application to Mus musculus and Drosophila melanogaster." Methods Mol Biol 371: 267-287.
- Gingras, D. and R. Béliveau (2011). "Colorectal Cancer Prevention Through Dietary and Lifestyle Modifications." Cancer Microenvironment 4(2): 133-139.
- Glatt, H., H. Boeing, et al. (2001). "Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 482(1-2): 27-40.
- Glatt, H., H. Schneider, et al. (2005). "V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals." Mutat Res 580(1-2): 41-52.
- Glatt, H., H. Schneider, et al. (2012). "Hydroxymethyl-substituted furans: mutagenicity in Salmonella typhimurium strains engineered for expression of various human and rodent sulphotransferases." Mutagenesis 27(1): 41-48.
- Glatt H., S. Y. (2006). Health risks of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and other related compounds. Acrylamid and other health hazardous compounds in heat-treated foods. A. J. Skog K. Cambridge, England, Woodhead Publishing: 328-353.
- Goss, K. H. and J. Groden (2000). "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." Journal of Clinical Oncology 18(9): 1967-1979.
- Half, E., D. Bercovich, et al. (2009). "Familial adenomatous polyposis." Orphanet Journal of Rare Diseases 4.
- Hempel, N., N. Gamage, et al. (2007). "Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1." Int J Biochem Cell Biol 39(4): 685-689.
- Higuchi, Y. (2004). "Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis." Journal of Cellular and Molecular Medicine 8(4): 455-464.
- Husoy, T., M. Haugen, et al. (2008). "Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure." Food and Chemical Toxicology 46(12): 3697-3702.
- Jacoby, R. F., D. J. Marshall, et al. (1996). "Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc (Min) mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam." Cancer Res 56(4): 710-714.

- Jaiswal, A. S., R. Balusu, et al. (2006). "Mechanism of adenomatous polyposis coli (APC)-mediated blockage of long-patch base excision repair." Biochemistry 45(51): 15903-15914.
- Jaiswal, A. S. and S. Narayan (2008). "A novel function of adenomatous polyposis coli (APC) in regulating DNA repair." Cancer Lett 271(2): 272-280.
- Janzowski, C., V. Glaab, et al. (2003). "Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells." Mutagenesis 18(5): 465-470.
- Janzowski, C., V. Glaab, et al. (2000). "5-hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione." Food and Chemical Toxicology 38(9): 801-809.
- Kim, H. K., Y. W. Choi, et al. (2011). "5-Hydroxymethylfurfural from black garlic extract prevents TNFalpha-induced monocytic cell adhesion to HUVECs by suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression, reactive oxygen species generation and NF-kappaB activation." Phytother Res 25(7): 965-974.
- kreftforeningens-blogg.no. (2010). "Norsk kreftbehandling på det jevne."
- Lambert, L. B., T. M. Singer, et al. (2005). "Detailed review of transgenic rodent mutation assays." Mutation Research-Reviews in Mutation Research 590(1-3): 1-280.
- Loft, S. and H. E. Poulsen (1996). "Cancer risk and oxidative DNA damage in man." Journal of Molecular Medicine-Jmm 74(6): 297-312.
- Lu, D., M. M. Sullivan, et al. (2009). "Degraded protein adducts of cis-2-butene-1,4-dial are urinary and hepatocyte metabolites of furan." Chem Res Toxicol 22(6): 997-1007.
- Maddox, C., B. Wang, et al. (2008). "Mutagenicity of 3-methylcholanthrene, pcb3, and 4-oh-pcb3 in the lung of transgenic bigblue rats." Environ Toxicol Pharmacol 25(2): 260-266.
- Mahabir, A. G., J. van Benthem, et al. (2008). "Detecting genotoxic effects of potential clastogens: an in vivo study using the transgenic lacZ plasmid and the MutaMouse model." Mutat Res 652(2): 151-157.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyl radicals and DNA damage." Carcinogenesis 21(3): 361-370.
- Mayo, M. W. and A. S. Baldwin (2000). "The transcription factor NF-κB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1470(2): M55-M62.
- Meinl, W., J. H. N. Meerman, et al. (2002). "Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in Salmonella typhimurium." Pharmacogenetics 12(9): 677-689.
- Monien, B. H., W. Engst, et al. (2012). "Mutagenicity of 5-Hydroxymethylfurfural in V79 Cells Expressing Human SULT1A1: Identification and Mass Spectrometric Quantification of DNA Adducts Formed." Chem Res Toxicol 25(7): 1484-1492.
- Monien, B. H., H. Frank, et al. (2009). "Conversion of the Common Food Constituent 5-Hydroxymethylfurfural into a Mutagenic and Carcinogenic Sulfuric Acid Ester in the Mouse in Vivo." Chemical Research in Toxicology 22(6): 1123-1128.
- Monien, B. H., K. Herrmann, et al. (2011). "Metabolic activation of furfuryl alcohol: formation of 2-methylfuranyl DNA adducts in Salmonella typhimurium strains expressing human sulfotransferase 1A1 and in FVB/N mice." Carcinogenesis 32(10): 1533-1539.
- Morales, F. J. (2008). "Hydroxymethylfurfural (HMF) and Related Compounds, in Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks."

- Morales, F. J., C. Romero, et al. (1996). "Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: Hydroxymethylfurfural and available lysine content." International Journal of Food Science and Technology 31(5): 411-418.
- Najafzadeh, M., A. Baumgartner, et al. (2012). "In vitro sensitivities to UVA of lymphocytes from patients with colon and melanoma cancers and precancerous states in the micronucleus and the Comet assays." Mutagenesis 27(3): 351-357.
- Narayan, S., A. S. Jaiswal, et al. (2005). "Tumor suppressor APC blocks DNA polymerase beta-dependent strand displacement synthesis during long patch but not short patch base excision repair and increases sensitivity to methylmethane sulfonate." J Biol Chem 280(8): 6942-6949.
- Narayan, S. and D. Roy (2003). "Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers." Mol Cancer 2: 41.
- Noda, Y., T. Suzuki, et al. (2002). "In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaMouse." Mutat Res 513(1-2): 205-212.
- O'Brien, P. J., A. G. Siraki, et al. (2005). "Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health." Crit Rev Toxicol 35(7): 609-662.
- Olsen, R., S. Ovrebø, et al. (2008). "Sensitive determination of a glyoxal-DNA adduct biomarker candidate by column switching capillary liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry." Analyst 133(6): 802-809.
- Pettersson, E., J. Lundeberg, et al. (2009). "Generations of sequencing technologies." Genomics 93(2): 105-111.
- Potter, J. D. (1999). "Colorectal cancer: Molecules and populations." Journal of the National Cancer Institute 91(11): 916-932.
- Scates, D. K., A. D. Spigelman, et al. (1993). "DNA adducts, detected by 32P-postlabelling, in DNA treated in vitro with bile from patients with familial adenomatous polyposis and from unaffected controls." Carcinogenesis 14(6): 1107-1110.
- Severin, I., C. Dumont, et al. (2010). "Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays." Toxicology Letters 192(2): 189-194.
- Sun, Z., Y. Zhu, et al. (2012). "Reported intake of selected micronutrients and risk of colorectal cancer: results from a large population-based case-control study in Newfoundland, Labrador and Ontario, Canada." Anticancer Res 32(2): 687-696.
- Surh, Y. J., A. Liem, et al. (1994). "5-SULFOXYMETHYLFURFURAL AS A POSSIBLE ULTIMATE MUTAGENIC AND CARCINOGENIC METABOLITE OF THE MAILLARD REACTION-PRODUCT, 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL." Carcinogenesis 15(10): 2375-2377.
- Surh, Y. J. and S. R. Tannenbaum (1994). "ACTIVATION OF THE MAILLARD REACTION-PRODUCT 5-(HYDROXYMETHYL)FURFURAL TO STRONG MUTAGENS VIA ALLYLIC SULFONATION AND CHLORINATION." Chemical Research in Toxicology 7(3): 313-318.
- Svendsen, C., W. Meinl, et al. (2011). "Intestinal carcinogenesis of two food processing contaminants, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 5-hydroxymethylfurfural, in transgenic FVB min mice expressing human sulfotransferases." Mol Carcinog.
- Teubner, W., W. Meinl, et al. (2007). "Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract." Biochem J 404(2): 207-215.

- Wages Jr, J. M. (2005). POLYMERASE CHAIN REACTION. Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition). W. Editors-in-Chief: Paul, T. Alan and P. Colin. Oxford, Elsevier: 243-250.
- Wang, M., K. Dhingra, et al. (1996). "Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5(9): 705-710.
- WHO, w. h. o. (2012). "Cancer."
- Xu, X., E. Yu, et al. (2012). "Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: A meta-analysis of observational studies." Int J Cancer.
- Zhang, X. M., C. C. Chan, et al. (1993). "INITIATION AND PROMOTION OF COLONIC ABERRANT CRYPT FOCI IN RATS BY 5-HYDROXYMETHYL-2-FURALDEHYDE IN THERMOLYZED SUCROSE." Carcinogenesis 14(4): 773-775.

7. Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over alle observerte mutasjoner i lever hos Min og wt gitt mus gitt én enkel subkutan injeksjon 3-6 dager etter fødsel med enten HMF 500 mg/kg kroppsvekt eller 0,9 % NaCl (kontroll) og deres lokasjon i LacZ plasmidet.

Kontroll	wt	Kontroll	Min	HMF	wt	HMF	Min
Posisjon	Endring	Posisjon	Endring	Posisjon	Endring	Posisjon	Endring
198	T→A	267	G→T	246	G→T	45	A→T
267	G→T	269	A→C	267	G→T	267	G→T
269	A→C	393	C→T	269	A→C	269	A→C
379	T→C	397	T→C	281	T→C	292	A→T
380	G→T	398	T→C	394	G→T	294	C→T
381	A→G	403	G→T	427	C→T	295	G→T
396	T→G	426	C→T	527	A→G	296	C→T
397	T→C	427	C→T	539	T→G	394	G→T
398	T→C	428	G→T	555	T→C	396	T→G
427	C→T	519	A→C	585	T→C	398	T→C
503	C→T	527	A→G	788	T→C	401	C→T
527	A→G	539	T→C	854	C→T	427	C→T
556	T→C	539	T→A	856	C→T	428	G→T
560	T→C	578	G→C	900	T→G	456	G→T
560	T→A	582	T→G	1189	A→C	457	A→G
788	T→C	585	T→A	1195	A→C	496	A→C
854	C→T	586	A→C	1197	G→T	522	A→C
1189	A→C	594	A→C	1198	C→G	523	A→C
1195	A→C	596	A→C	1198	C→T	527	A→G
1197	G→T	788	T→C	1198	C→A	557	T→G
1198	C→G	842	T→C	1199	C→T	560	T→C
1198	C→A	854	C→T	1200	T→G	573	C→T
1199	C→T	1195	A→C	1207	T→G	590	G→C
1200	T→G	1198	C→A	1212	T→C	594	A→C
1207	T→G	1199	C→T	1214	C→T	596	A→T
1216	G→A	1200	T→G	1216	G→A	788	T→C
1217	C→T	1207	T→G	1217	C→T	788	T→A
1218	G→C	1216	G→A	1218	G→C	854	C→T
1221	G→T	1217	C→T	1218	G→A	1189	A→C
1225	G→T	1218	G→C	1221	G→T	1195	A→C
1232	A→C	1221	G→T	1225	G→T	1197	G→T
1233	A→T	1225	G→T	1226	G→T	1198	C→G
1234	A→G	1232	A→C	1227	A→G	1198	C→T
1236	G→A	1233	A→T	1232	A→C	1198	C→A

1238	T→C	1234	A→G	1233	A→T	1199	C→T
1240	T→G	1236	G→A	1234	A→G	1200	T→G
1245	C→A	1240	T→G	1235	T→A	1207	T→G
1248	C→T	1240	T→C	1236	G→A	1216	G→A
1254	G→T	1245	C→A	1236	G→T	1217	C→T
1256	C→G	1248	C→T	1237	G→A	1218	G→C
1260	C→T	1254	G→T	1238	T→A	1221	G→T
1263	T→C	1256	C→G	1238	T→G	1225	G→T
1264	T→C	1260	C→T	1240	T→G	1232	A→C
1280	T→G	1263	T→C	1245	C→A	1233	A→T
1294	A→T	1264	T→C	1248	C→T	1234	A→G
1459	A→T	1280	T→G	1254	G→T	1236	G→A
1463	T→G	1294	A→T	1256	C→G	1238	T→A
1465	A→G	1454	A→C	1260	C→T	1240	T→G
1467	A→C	1455	G→C	1263	T→C	1245	C→A
1468	C→A	1459	A→T	1264	T→C	1248	C→T
1483	C→A	1460	T→A	1280	T→G	1254	G→T
1485	A→T	1467	A→C	1294	A→T	1256	C→G
1485	A→G	1470	C→A	1386	T→C	1260	C→T
1697	C→G	1471	A→C	1427	C→A	1263	T→C
1698	A→T	1474	G→C	1452	G→A	1264	T→C
1699	C→G	1489	A→T	1459	A→T	1279	T→A
1700	G→T	1684	G→A	1460	T→A	1280	T→G
1701	G→T	1685	C→G	1463	T→G	1294	A→T
1702	C→G	1691	C→A	1467	A→C	1303	T→C
1702	C→T	1693	A→C	1471	A→C	1427	C→A
1703	C→T	1693	A→G	1483	C→A	1454	A→C
1703	C→A	1694	C→A	1484	A→C	1454	A→G
1704	A→C	1695	A→G	1485	A→T	1457	C→A
1706	C→G	1697	C→G	1494	C→T	1459	A→T
1712	T→G	1698	A→G	1497	G→C	1479	G→T
1734	G→T	1699	C→T	1498	C→A	1483	C→A
1856	T→G	1699	C→G	1685	C→G	1485	A→T
1870	A→G	1700	G→T	1686	G→C	1489	A→T
1896	C→T	1701	G→T	1690	C→G	1608	C→T
2158	G→A	1702	C→G	1691	C→G	1609	A→T
2174	G→T	1703	C→G	1692	G→C	1686	G→C
2235	G→T	1704	A→C	1693	A→C	1687	G→A
2258	T→G	1712	T→G	1696	C→G	1690	C→G
2270	A→C	1734	G→T	1697	C→G	1691	C→G
2291	C→G	1747	A→C	1701	G→T	1692	G→C
2335	C→T	1820	C→T	1702	C→T	1697	C→G
2335	C→A	1823	T→C	1716	T→G	1698	A→G
2484	T→G	1829	A→C	1734	G→T	1699	C→T
2528	T→G	1833	G→C	1856	T→G	1699	C→G
2581	C→T	1837	A→C	1862	T→G	1700	G→T

2582	G→T	1841	G→C	1869	A→G	1701	G→T
2583	C→G	1851	A→C	1871	A→T	1702	C→T
2585	G→C	1856	T→G	1896	C→T	1703	C→T
2615	C→T	1864	T→C	1924	A→G	1704	A→C
2760	A→C	1871	A→T	2149	T→A	1705	C→G
2773	G→C	1881	G→C	2158	G→A	1706	C→G
2775	C→G	1882	C→G	2235	G→T	1734	G→T
2776	G→C	1894	A→T	2244	G→A	1791	T→C
2792	T→G	1896	C→T	2248	A→C	1822	T→C
2926	A→T	1899	C→G	2251	A→C	1829	A→C
2927	A→T	1914	T→C	2329	A→C	1833	G→C
2928	G→T	1915	T→C	2335	C→A	1837	A→C
2929	A→T	2149	T→A	2484	T→G	1839	G→A
3162	A→C	2149	T→C	2582	G→T	1856	T→G
3164	A→T	2158	G→A	2584	T→G	1871	A→T
3182	T→G	2174	G→T	2585	G→C	1884	T→G
3184	T→C	2199	A→C	2592	G→T	1896	C→T
3197	T→G	2201	G→C	2592	G→T	1899	C→G
3213	T→C	2244	G→C	2615	C→T	1900	G→T
3214	G→T	2254	T→G	2616	C→T	1914	T→C
3215	G→A	2258	T→C	2621	T→G	1917	G→T
3220	C→G	2324	A→C	2676	G→T	1919	C→T
		2329	A→C	2708	T→G	2149	T→A
		2334	A→C	2753	G→A	2156	T→G
		2335	C→A	2760	A→C	2158	G→A
		2581	C→T	2786	C→A	2174	G→T
		2582	G→T	3197	T→G	2254	T→G
		2585	G→C	3215	G→A	2258	T→G
		2614	C→T	3221	G→T	2335	C→T
		2615	C→T	3221	G→C	2335	C→A
		2616	C→T	3222	T→G	2582	G→T
		2621	T→G	3223	C→T	2583	C→G
		2662	A→C			2584	T→C
		2683	T→C			2584	T→G
		2683	T→G			2585	G→C
		2686	T→C			2614	C→T
		2705	A→C			2615	C→T
		2737	A→C			2616	C→T
		2738	C→G			2621	T→G
		2739	G→A			2760	A→C
		2747	G→C			2764	T→A
		2753	G→C			2781	A→C
		2755	G→C			3047	A→T
		2758	A→T			3115	A→C
		2760	A→C			3150	G→A
		2762	C→G			3152	G→C

2772	A→C	3177	G→C
2779	A→C	3177	G→A
2780	A→C	3191	G→T
2781	A→C	3196	T→A
2788	G→C	3197	T→G
2792	T→C	3200	T→G
2796	G→C	3201	G→T
2840	C→A	3204	G→A
2942	C→A	3207	G→A
2966	C→A	3207	G→C
2984	G→T	3213	T→G
3054	T→A	3215	G→A
3055	A→T	3217	G→C
3056	T→G	3220	C→G
3058	G→C	3223	C→T
3133	A→C	3223	C→A
3139	A→C		
3140	T→A		
3141	C→T		
3160	G→C		
3164	A→C		
3185	C→T		
3191	G→T		
3196	T→A		
3197	T→G		
3207	G→C		
3215	G→A		
3222	T→G		
3223	C→T		
3223	C→A		
3224	A→G		